

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

FARAG A. ABUSDEG

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ *IN VITRO*
ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΨΑΡΙΩΝ –
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ
ΑΥΞΗΣΗΣ

2012

Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μέτρηση *in vitro* πεπτικότητας
σιτηρεσίων μεσογειακών ειδών ψαριών – Εκτίμηση της διατροφικής
αξίας και του ρυθμού αύξησης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

A. ΜΟΥΤΟΥ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Z. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

M. ΑΛΕΞΗ

Ερευνήτρια Α βαθμίδας
Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών ΕΛ.Κ.Θ.Ε.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

M. ΑΛΕΞΗ

Ερευνήτρια Α βαθμίδας
Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών ΕΛ.Κ.Θ.Ε.

Z. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

A. ΜΟΥΤΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Σ. ΚΛΑΟΥΔΑΤΟΣ

Καθηγητής Εκτροφής υδρόβιων οργανισμών
Τμήμα Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος

Π. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ

Επίκουρος Καθηγήτρια Υδατοκαλλιεργείες
Τμήμα Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος Π.Θ.

Ε. ΜΗΛΙΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας
Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας Γ. Π. Α.

Γ. ΝΕΓΚΑΣ

Ερευνητής Β βαθμίδας
Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών ΕΛ.Κ.Θ.Ε.

FARAG A. ABUSDEG

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ *IN VITRO*
ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΨΑΡΙΩΝ –
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ
ΑΥΞΗΣΗΣ

FARAG A. ABUSDEG

2012

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ *IN VITRO*
ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΨΑΡΙΩΝ –
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ
ΑΥΞΗΣΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: xiv

Συνολικός αριθμός σελίδων: 177

Αριθμός πινάκων: 46

Αριθμός εικόνων: 43

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 208

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη είχε βασικό σκοπό την ανάπτυξη και τη βελτίωση της μεθόδου pH-stat για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης στο λαβράκι και τη μελέτη τις επιδράσεις των περιβαλλοντολογικών και βιολογικών παραμέτρων στο βαθμό της αυτοϋδρόλυσης και της ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιώντας τη στατιστική και το διαφορικό λογισμό, υπό μορφή αναπτυσσόμενων εξισώσεων. Τα αποτελέσματα απέδειξαν πως η εκάστοτε μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, η εκάστοτε αύξηση του επιπέδου pH, η εκάστοτε αύξηση της θερμοκρασίας, η εκάστοτε μείωση της αλατότητας επηρεάζουν θετικά το βαθμό αυτοϋδρόλυσης και το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης. Η προηγούμενη όξινη πέψη δεν βελτίωσε σημαντικά το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης. Το διαφορετικό ενζυμικό προφίλ λαβρακιού επηρεάζει το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η βελτιωμένη μέθοδος pH-stat για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης πειραματικών σιτηρεσίων διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας οσπρίων (εξώθηση και αποφλοΐωση) και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης (φυτικής και ζωικής) σε 4 διαφορετικές αναλογίες συγκέντρωσης υποστρώματος ανά U ενζυμικής δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών τσιπούρας και τη συσχέτιση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ η οποία προέκυψε από ανάπτυξη εξίσωσης των σιτηρεσίων με αποτελέσματα δεικτών πεπτικότητας διατροφικής πρωτεΐνης *in vivo* σε τσιπούρα, τα αποτελέσματα ήταν θετικές δηλώνοντας την ακρίβεια της μεθόδου pH-stat.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος pH-stat για το προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης παρασκευασμένων σιτηρεσίων, ένα από τα οποία περιείχε ανασυνδιασμένα ένζυμα πρωτεασών (CHTRI, CHTRII, TRPII) μικροβίων σε διάφορες αναλογίες συγκέντρωση υποστρώματος / U. Η προσθήκη των ανασυνδιασμένων ενζύμων δεν έδωσε κανένα αποτέλεσμα. Διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης του κάθε ανασυνδιασμένο ενζύμου ξεχωριστά στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης, Η CHTRII έδωσε καλύτερους βαθμούς άλλα όχι σε σχέση με εκχύλισμα πυλωρικών τυφλών τσιπούρας.

Συμπερασματικά, η μέθοδος pH-stat απεδείχθη οικονομική και παρέχει γρήγορα και διαθέσιμα αποτελέσματα και είναι εύκολη στην εκτέλεση. Η χρήση μη γραμμικών εξισώσεων είναι η ιδανική μέθοδος επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και η συσχέτιση τους με άλλους βιολογικούς παραμέτρους.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση και η συγγραφή μιας διδακτορικής διατριβής είναι αποτέλεσμα επίπονης προσπάθειας και επιτυγχάνεται μόνο με τη συνεργασία και τη συμπαράσταση πολλών ατόμων. Σε όλους αυτούς θέλω να απευθύνω τις ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους στην εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Ένα θερμό ευχαριστώ στην Επίκουρο Καθηγήτρια Κατερίνα Μούτου, η οποία μου έκανε την τιμή να με δεχτεί ως επιβλέπουσα αυτής της διδακτορικής διατριβής. Χωρίς την πολύπλευρη συμπαράστασή της, την επιστημονική της ακρίβεια, την καθημερινή βοήθεια και τις εποικοδομητικές της συμβουλές αλλά και τη φιλική υποστήριξή της δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Μαρία Αλέξη η οποία, εκτός από την καταλυτική της βοήθεια στο ξεκίνημα αυτής της διατριβής, μαζί με τους συνεργάτες της επιστήμονες και τεχνικούς μου παρείχαν πλήρη υποστήριξη και συμπαράσταση αλλά και την απαραίτητη υλικοτεχνική υποδομή.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω επίσης στον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη για την ενθάρρυνση και την ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφερε.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Σ. Κλαουδάτος, την Επίκουρο Καθηγήτρια Π. Παναγιωτάκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε. Μήλιου και τον Ερευνητή Β βαθμίδας Γ. Νέγκα που μου έκαναν την τιμή να δεχτούν να συμμετάσχουν στην Εξεταστική Επιτροπή αυτής της διδακτορικής διατριβής και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της.

Θερμά ευχαριστώ τον Κ. Σταμάτη για την τεχνική υποστήριξη και τη Λέκτορα Θ. Σαραφίδου που μου παρείχε τα ανασυνδιασμένα ένζυμα.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, τα αδέρφια μου, τη θεία μου, τη γιαγιά μου και τους φίλους μου στη Λάρισα. Η αγάπη, η εμπιστοσύνη και η ηθική τους υποστήριξη τα τελευταία αυτά τα χρόνια, με βοήθησαν να ανταπεξέλθω όλες τις δυσκολίες τις οποίες αντιμετώπισα.

Στον Αλί...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εξέλιξη των υδατοκαλλιεργειών	1
1.2. Μεσογειακά είδη ιχθύων	3
1.3. Φυσιολογία πέψης μεσογειακών ειδών	5
1.4. Οι διατροφικές ανάγκες των μεσογειακών ιχθύων	12
1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την πέψη	12
1.6. Τα σιτηρέσια	21
1.7. Πρώτες ύλες στα σιτηρέσια	27
1.8. Μέθοδοι υπολογισμού πεπτικότητας	30
1.9 Σκοπός της μελέτης	35

Κεφάλαιο 2

ΑΝΑΠΥΞΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *IN VITRO*

2.1. Εισαγωγή	38
2.2. Υλικά και μέθοδοι	39
2.3. Ανάπτυξη εξίσωσης και στατιστική επεξεργασία	46
2.4. Αποτελέσματα	49
2.4.1. Στατιστική επεξεργασία	53
2.4.2. Ανάπτυξη εξίσωσης	65
2.5. Συζήτηση	95

Κεφάλαιο 3

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΛΟΓΙΑΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ

3.1. Εισαγωγή	120
3.2. Υλικά και μέθοδοι	122
3.2.1 Ανάπτυξη εξίσωσης και συσχέτιση των πειραματικών τιμών Της μεταβλητής παράμετρος ΝΤΠ και στατιστική επεξεργασία	124
3.3. Αποτελέσματα	125
3.4. Συζήτηση	134

Κεφάλαιο 4

ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ

4.1. Εισαγωγή	140
4.2. Υλικά και μέθοδοι	141
4.3. Ανάπτυξη εξίσωσης και στατιστική επεξεργασία	146

4.4. Αποτελέσματα	148
4.5. Συζήτηση	154
Κεφάλαιο 5	
Συμπεράσματα	159
Βιβλιογραφία	161

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.1.** (Σελ.8) Γενικά χαρακτηριστικά των κυριότερων πεπτικών ενζύμων των ιχθύων.
- Πίνακας 1.2.** (Σελ.14) Σύνοψη των γνωστών διατροφικών αναγκών του λαβρακιού.
- Πίνακας 1.3.** (Σελ.15) Σύνοψη των γνωστών διατροφικών αναγκών της τσιπούρας.
- Πίνακας 2.1.** (Σελ.41) Εκατοστιαία σύνθεση και ολική σύσταση του πειραματικού σιτηρεσίου λαβρακιού CB.
- Πίνακας 2.2.** (Σελ.46) Εκατοστιαία σύνθεση, και ολική σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκτροφή λαβρακιών.
- Πίνακας 2.3.** (Σελ.54) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*συγκέντρωση σιτηρεσίου, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.4.** (Σελ.54) Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (*pH, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.5.** (Σελ.55) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*pH, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.6.** (Σελ.56) Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες της θερμοκρασίας σε επίπεδο σημαντικότητας (95%) (*θερμοκρασία, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.7.** (Σελ.56) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*θερμοκρασία, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.8.** (Σελ.57) Ανάλυση διακύμανσης με δύο παράγοντες του ποσοστού της αλατότητας σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (*αλατότητα, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.9.** (Σελ.57) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*αλατότητα, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.10.** (Σελ.59) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*συγκέντρωση σιτηρεσίου, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.11.** (Σελ.60) Ανάλυση διακύμανσης με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (*pH, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.12.** (Σελ.61) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*pH, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.13.:** (Σελ.62) Ανάλυση διασποράς με δυο παράγοντες σε επίπεδο σημαντικότητας 95% (*θερμοκρασία, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.14.** (Σελ.62) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*θερμοκρασία, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.15.** (Σελ.63) Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (*αλατότητα, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.16.** (Σελ.63) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (*αλατότητα, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.17.** (Σελ.68) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης δεύτερης τάξης (*pH, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.18.** (Σελ.69) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης τρίτης τάξης (*θερμοκρασία, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.19.** (Σελ.72) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης τέταρτης τάξης σύμφωνα με την τελευταία προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων αυτοϋδρολύσεων (*αλατότητα, αυτοϋδρόλυση*).
- Πίνακας 2.20.** (Σελ.73) Ποιοί από τους διάφορους παράγοντες επηρεάζουν το βαθμό αυτοϋδρόλυσης περισσότερο ($\Delta f(x)$, $\Delta f(pH)$, $\Delta f(T^{\circ}C)$, $\Delta f(S\%)$).
- Πίνακας 2.21.** (Σελ.76) Χαρακτηριστικά της εξίσωσης δεύτερης τάξης (*pH, ενζυμική υδρόλυση*).
- Πίνακας 2.22.** (Σελ.78) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης τρίτης τάξης (*θερμοκρασία, ενζυμική υδρόλυση*).

Πίνακας 2.23. (Σελ.81) Τα χαρακτηριστικά των εξισώσεων τέταρτης τάξης (αλατότητα, ενζυμική υδρόλυση).

Πίνακας 2.24. (Σελ.85) Οι δραστηριότητες των διάφορων πεπτικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου CB.

Πίνακας 2.25. (Σελ.88) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης ένατης τάξης.

Πίνακας 2.26. (Σελ.89) Ποιοί από τους διάφορους παράγοντες επηρεάζουν το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης περισσότερο ($\Delta f(x)$, $\Delta f(pH)$, $\Delta f(T^{\circ}C)$, $\Delta f(S\%)$, $\Delta f(E)$, $\Delta f(P)$).

Πίνακας 2.27. (Σελ.89) Ποιός βαθμός, της ενζυμικής υδρόλυσης (a) ή της αυτοϋδρόλυσης (b) επηρεάζεται περισσότερο από τους διάφορους παράγοντες και με ποία σειρά ($(\Delta f(x_a) - \Delta f(x_b))$, $(\Delta f(pH_a) - \Delta f(pH_b))$, $(\Delta f(T^{\circ}C_a) - \Delta f(T^{\circ}C_b))$, $(\Delta f(S\%_a) - \Delta f(S\%_b))$).

Πίνακας 2.28. (Σελ.90) Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (pH και θερμοκρασία).

Πίνακας 2.29. (Σελ.91) Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (Αλατότητα).

Πίνακας 2.30. (Σελ.91) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (pH).

Πίνακας 2.31. (Σελ.92) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (pH, θερμοκρασία, αλατότητα).

Πίνακας 2.32. (Σελ.93) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (Ενζυμικό προφίλ).

Πίνακας 2.33. (Σελ.94) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (όξινης προ-πέψης).

Πίνακας 3.1. (Σελ.123) Σύνθεση και ποσοστιαία σύσταση (%) των πειραματικών σιτηρεσίων σε άτομα τσιπούρας.

Πίνακας 3.2. (Σελ.124) (%) Σχετικοί δείκτες πεπτικότητας πρωτεϊνών των πειραματικών σιτηρεσίων.

Πίνακας 3.3. (Σελ.125) Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Πίνακας 3.4. (Σελ.125) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

Πίνακας 3.5. (Σελ.127) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ κατά την αυτοϋδρόλυση. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς εξετάσεις επαλήθευσης

Πίνακας 3.6. (Σελ.127) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ κατά την ενζυμική υδρόλυση.

Πίνακας 4.1. (Σελ.149) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων ενζύμων.

Πίνακας 4.1. (Σελ.140) Τα αποτελέσματα βασικών βιολογικών παραμέτρων του πειράματος *in vivo* με χρήση του σιτηρεσίου, μάρτυρας C, και του σιτηρεσίου με ανασυνδυασμένα ένζυμα E

Πίνακας 4.2. (Σελ.150) Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD.

Πίνακας 4.3. (Σελ.151) Ανάλυση t-test για τις βιολογικές παραμέτρους των ιχθύων κατά την διάρκεια του πειράματος

Πίνακας 4.4. (Σελ.152) Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης με χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων πρωτεασών.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. (Σελ.2) Παραγωγή λαβρακιού σε τόνους από μεσογειακές χώρες ανά αλατότητα.

Εικόνα 1.2. (Σελ.2) Παραγωγή λαβρακιού σε τόνους από μεσογειακές χώρες ανά ήπειρο.

Εικόνα 1.3. (Σελ.3) Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*).

Εικόνα 1.4. (Σελ.4) Τσιπούρα (*Sparus aurata*).

Εικόνα 1.5. (Σελ.10) Η πέψη των διατροφικών πρωτεϊνών στους ιχθύες ακολουθεί πολλές οδούς ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά.

Εικόνα 2.1. (Σελ.41) Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος pH-stat.

Εικόνα 2.2. (Σελ.41) Φωτογραφία του συστήματος pH-stat.

Εικόνα 2.3. (Σελ.53) Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*συγκέντρωση σιτηρεσίου, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.4. (Σελ.55) Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στα διάφορα επίπεδα pH σε σχέση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*pH, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.5. (Σελ.56) Βαθμοί αυτοϋδρόλυσεων των διατροφικών πρωτεϊνών στις διάφορες θερμοκρασίες σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*θερμοκρασία, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.6. (Σελ.58) Βαθμοί αυτοϋδρόλυσεων των διατροφικών πρωτεϊνών σε διαφορετικά ποσοστά αλατότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*αλατότητα, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.7. (Σελ.60) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με την αναλογία της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας (*συγκέντρωση σιτηρεσίου, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.8. (Σελ.61) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στα διάφορα επίπεδα pH σε σχέση με την αναλογία συγκέντρωσης του σιτηρεσίου / U αλκαλικών πρωτεασών LSD (*pH, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.9. (Σελ.62) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στις διάφορες θερμοκρασίες σε σχέση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*θερμοκρασία, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.10. (Σελ.64) Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στα διάφορα ποσοστά αλατότητας σε σχέση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*αλατότητα, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.11. (Σελ.66) Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης πρώτης τάξης του βαθμού αυτοϋδρόλυσης του σιτηρεσίου σε διαφορετικές συνθήκες με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*συγκέντρωση σιτηρεσίου, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.12. (Σελ.68) Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης δεύτερης τάξης του βαθμού αυτοϋδρόλυσης του σιτηρεσίου CB σε διάφορα επίπεδα pH με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*pH, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.13. (Σελ.70) Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης τρίτης τάξης του βαθμού αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στις διάφορες θερμοκρασίες με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου όταν το pH = 8 (*θερμοκρασία, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.14. (Σελ.73) Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης τέταρτης τάξης των βαθμών αυτοϋδρόλυσεων των διατροφικών πρωτεϊνών στα διάφορα ποσοστά αλατότητας με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου όταν το pH = 8 και η θερμοκρασία = 25°C (*αλατότητα, αυτοϋδρόλυση*).

Εικόνα 2.15. (Σελ.75) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης πρώτης τάξης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*συγκέντρωση σιτηρεσίου, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.16. (Σελ.77) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης δεύτερης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στα διάφορα επίπεδα pH με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*pH, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.17. (Σελ.79) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης τρίτης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στις διάφορες θερμοκρασίες με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (*θερμοκρασία, ενζυμική υδρόλυση*).

Εικόνα 2.18. (Σελ.80) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης τέταρτης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στα διάφορα ποσοστά αλατότητας με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου όταν $\text{pH}=8$ και θερμοκρασία = 25°C (αλατότητα, ενζυμική υδρόλυση).

Εικόνα 2.19. (Σελ.85) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης όγδοης τάξης του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου από διαφορετικά εκχυλίσματα πεπτικών πρωτεασών.

Εικόνα 2.20. (Σελ.89) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης ένατης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου που έχουν υποστεί όξινη προ-πέψη σε διαφορετικά pH .

Εικόνα 3.1. (Σελ.128) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου CA.

Εικόνα 3.2. (Σελ.128) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου CB.

Εικόνα 3.3. (Σελ.129) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChP.

Εικόνα 3.4. (Σελ.129) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChPx.

Εικόνα 3.5. (Σελ.130) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChPD.

Εικόνα 3.6. (Σελ.130) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChPDx.

Εικόνα 3.7. (Σελ.131) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου P.

Εικόνα 3.8. (Σελ.131) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου Px.

Εικόνα 3.9. (Σελ.133) Γραμμική συσχέτιση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης κατά την αυτοϋδρόλυση με τους δείκτες πεπτικότητας των πρωτεϊνών *in vivo*.

Εικόνα 3.10. (Σελ.133) Γραμμική συσχέτιση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης κατά την ενζυμική υδρόλυση με τους δείκτες πεπτικότητας των πρωτεϊνών *in vivo*.

Εικόνα 4.1. (Σελ.144) Σύστημα παροχής νερού και οξυγόνου στις πειραματικές δεξαμενές.

Εικόνα 4.2. (Σελ.144) Μακρόστενες πειραματικές δεξαμενές μπλέ χρώματος.

Εικόνα 4.3. (Σελ.145) Αναμείκτης με στρόβιλο ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή σιτηρεσίου.

Εικόνα 4.4. (Σελ.145) Αναμείκτης με στρόβιλο ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή σιτηρεσίου.

Εικόνα 4.5. (Σελ.146) Πειραματικά ψάρια τσιπούρας.

Εικόνα 4.6. (Σελ.149) Μη γραμμικές συσχετίσεις των εξισώσεων N ανασυνδυασμένων ενζύμων των βαθμών υδρόλυσεων των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου CB με τις συγκεντρώσεις του σιτηρεσίου.

Εικόνα 4.7. (Σελ.151) Μέσος όρος βάρους των ιχθύων ανά ημέρα ζυγίσματος

Εικόνα 4.8. (Σελ.153) Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των διαφόρων βαθμών υδρόλυσης των παρασκευασμένων σιτηρεσίων C και E σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του σιτηρεσίου / U πρωτεάσες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

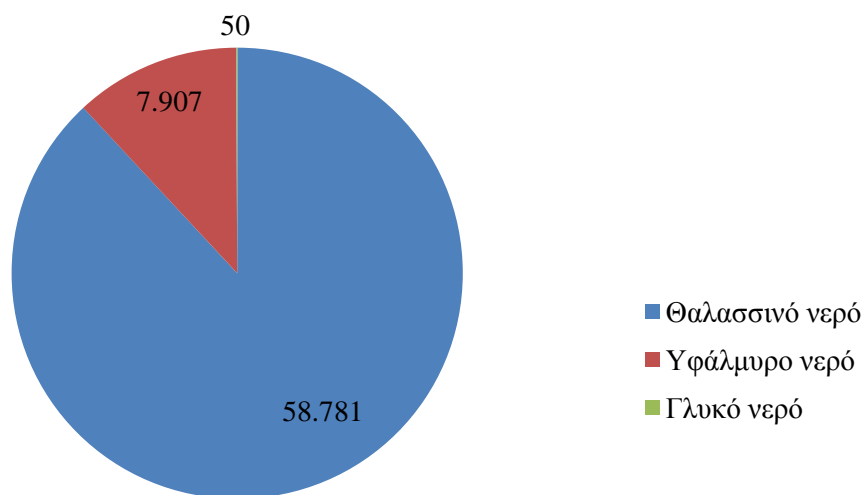
1.1. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η παγκόσμια παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας αυξάνει ταχύτατα σε σχέση με την παραγωγή άλλων ζωικών προϊόντων, από λιγότερο από ένα εκατομμύριο τόνους στις αρχές του 1950 σε 51,7 εκατομμύρια τόνους αξίας 78,8 δισεκατομμυρίων δολαρίων το 2006, με την Κίνα να κατέχει το 66,7% της παγκόσμιας αγοράς, η υπόλοιπη Ασία το 22,8% και ο υπόλοιπος κόσμος το 10,5% (F.A.O. 2008a).

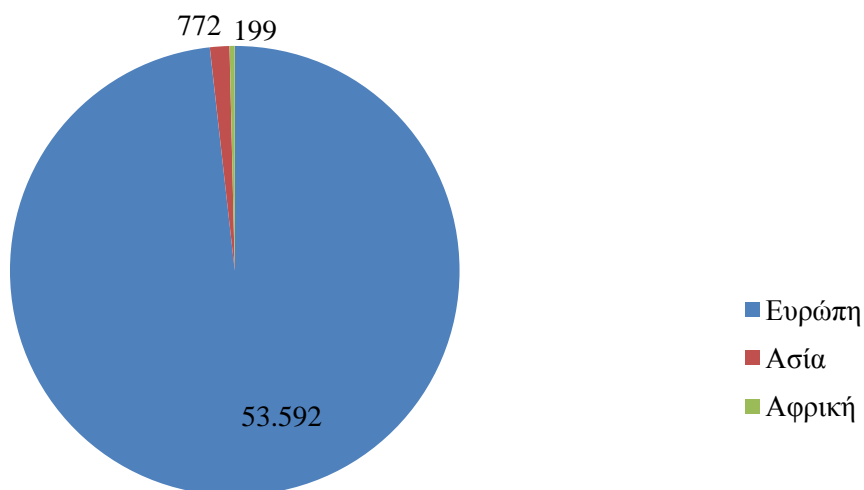
Η αιτία της ανοδικής αυτής πορείας οφείλεται κατά κύριο λόγο στη ραγδαία αύξηση του πληθυσμού του πλανήτη μας που είχε σαν αποτέλεσμα την υπερεκμετάλλευση των φυσικών πόρων και τη συνεχή μείωση των αποθεμάτων των φυσικών αλιευμάτων προκειμένου να καλύψει τις σιτιστικές ανάγκες του. Ωστόσο, η αύξηση της παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας ξεπέρασε κατά πολύ την αύξηση του πληθυσμού, καθώς το ατομικό μερίδιο υδατοκαλλιεργητικών προϊόντων αυξήθηκε από 0,7 kg το 1970 σε 7,8 kg το 2006, με μέσο όρο αύξησης 7% (F.A.O. 2008a), ενώ η παραγωγή από φυσικά αλιεύματα μειώθηκε κατά 2,2 εκατομμύρια τόνους το 2006 σε σχέση με την παραγωγή του 2005 (F.A.O. 2008a). Δεδομένου ότι το 76% των φυσικών αλιευμάτων των ωκεανών έχουν υποστεί υπερεκμετάλλευση, οι υδατοκαλλιέργειες θεωρούνται ο πλέον κατάλληλος τομέας παραγωγής ζωικών τροφίμων (Allsopp et al., 2009).

Στη Μεσόγειο θάλασσα έχει αναπτυχθεί τα τελευταία 25 χρόνια η εκτροφή λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρας (*Sparus aurata*) σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς, σε χερσαίες δεξαμενές διαφόρων σχημάτων, σε τεχνητές λίμνες και λιμνοθάλασσες (Εικόνα 1.1.). Η Ελλάδα με 34.956 τόνους λαβρακιού κατέχει την πρώτη θέση παγκοσμίως στην παραγωγή λαβρακιού, με δεύτερη την Ιταλία (7.200 τόννοι) και τρίτη την Ισπανία (5.309 τόννοι). Μόνο αυτές οι χώρες παράγουν το 80,70% της συνολικής παραγωγής λαβρακιού (F.A.O., 2008b). Η Ελλάδα με 51.705 τόνους τσιπούρας κατέχει επίσης την πρώτη θέση παγκοσμίως στην παραγωγή τσιπούρας, η Τουρκία τη δεύτερη (31.670 τόννοι) και η Ισπανία την τρίτη (16.538 τόννοι). Μόνο αυτές οι χώρες παράγουν το 79,34% της συνολικής παραγωγής τσιπούρας (F.A.O., 2008b).

Στο νότιο τμήμα της Μεσογείου (Εικόνα 1.2.) η εκτροφή τσιπούρας και λαβρακιού είναι σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης, με τη Λιβύη να παράγει μόλις 170 τόνους λαβρακιού και 60 τόνους τσιπούρας και το Μαρόκο 29 τόνους λαβρακιού (F.A.O., 2008 b).



Εικόνα 1.1.: Παραγωγή λαβρακιού σε τόνους από μεσογειακές χώρες ανά αλατότητα



Εικόνα 1.2.: Παραγωγή λαβρακιού σε τόνους από μεσογειακές χώρες ανά ήπειρο

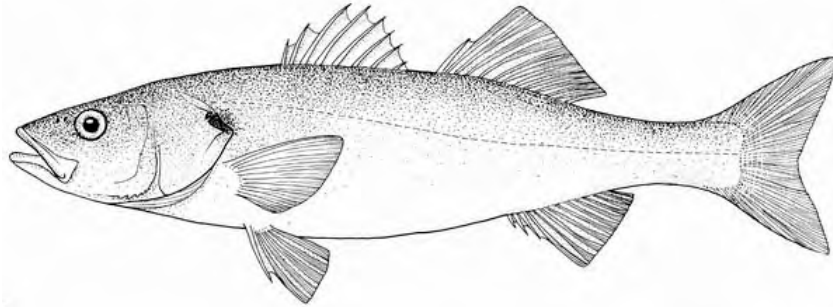
Πηγή: F.A.O., (2008b). Ειδική επεξεργασία του προγράμματος fishstat *plus*, version 2.32

Ο αριθμός μονάδων υδατοκαλλιεργειών αυξήθηκε επίσης από 3.832.000 το 1990 σε 8.663.000 το 2004 παγκοσμίως (F.A.O., 2008a).

1.2. ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΑ ΕΙΔΗ ΙΧΘΥΩΝ

1.2.1. ΛΑΒΡΑΚΙ (*Dicentrarchus labrax*)

Το λαβράκι ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερύγιων, στην υπερτάξη των Ακανθοπτερύγιων, στην τάξη Perciformes και στην οικογένεια Serranidae.



Εικόνα 1.3.: Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Στρογγυλός ιχθύς με επίμηκες σώμα και ευρύ στόμα, το οποίο χρησιμοποιεί για τη σύλληψη μικρών ιχθύων και διαφόρων ασπόνδυλων συμπεριλαμβανομένων γαρίδων, οστρακοειδών, καλαμαριών και άλλων κεφαλόποδων (F.A.O., 2010). Το χρώμα του είναι γκρι πρασινωπό, μαύρο κατά μήκος της πλάτης με ασημή πλευρά και άσπρη κοιλιά. Έχει μαύρα στίγματα στην πλάτη και τα πλευρά σε νεαρή ηλικία τα οποία εξαφανίζονται καθώς ενηλικιώνεται.

Απαντάται από την δυτική πλευρά της Μαύρης θάλασσας έως τις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού ωκεανού, βόρεια έως την Ιρλανδία και τη Βαλτική βόρεια θάλασσα και νότια από το Μαρόκο έως την Σενεγάλη και τη Μεσόγειο θάλασσα (Tortonese, 1984). Απαντάται σε ύδατα διαφορετικής αλατότητας: στη θάλασσα, σε λιμνοθάλασσες, ακόμη και σε ποτάμια (Chervinski, 1975). Ωστόσο, έχουν καταγραφεί θνησιμότητα σε ιχθύδια, τα οποία εκτέθηκαν σε χαμηλή αλατότητα εξαιτίας της αλλαγής της αρτηριακής οσμωτικής πίεσης (Giffard-Mena et al, 2008).

Τα εκτρεφόμενα ιχθύδια σε θαλασσινό νερό παρουσιάζουν συντελεστή αύξησης βάρους 20% - 30 % μεγαλύτερο από εκείνα του γλυκού νερού (Eroldogan et al., 2004).

Το τελικό εμπορεύσιμο μέγεθος του λαβρακιού είναι περίπου σε μήκος 32 cm και σε βάρος 350 g \pm 50g. Σήμερα χρειάζονται 16-24 μήνες για την επίτευξη του εμπορεύσιμου μεγέθους (Abusdeg, 2004). Η ιχθυοφόρτιση στα συστήματα εκτροφής τους ποικίλλει από 2 Kg/m³ σε εκτατικό σύστημα εκτροφής (λιμνοθάλασσες), σε 20 Kg/m³ έως 30 Kg/m³ σε εντατικό σύστημα εκτροφής (με ανανέωση νερού) και σε 20 Kg/m³ σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς (Coves et al., 1991). Η βελτίωση των σιτηρεσίων εκτροφής, η καλύτερη πρακτική διαχείριση των μονάδων, η βελτίωση της ποιότητας των νεαρών ατόμων, συνέβαλαν στη μείωση του χρονικού διαστήματος για την επίτευξη του εμπορεύσιμου μεγέθους.

Οι ιχθύς με βάρος άνω του 1Kg είναι από φυσικά αλιεύματα. Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην χημική σύνθεση των εκτρεφόμενων λαυρακιών από εκείνα των φυσικών αλιευμάτων

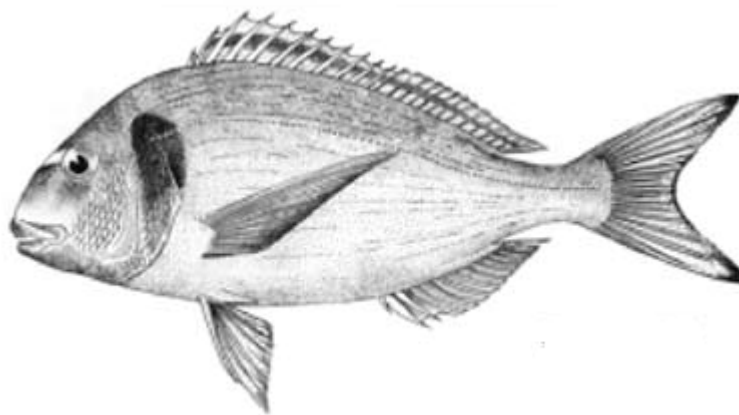
και συγκεκριμένα: τα εκτρεφόμενα περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό λίπους, διαφορές στις αναλογίες των λιπαρών οξέων, στο ποσοστό των ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων, στην περιεκτικότητά τους σε ιχνοστοιχεία όπως σίδηρος, αργίλιο, τιτάνιο, βανάδιο (Alasalvar et al., 2002; Ibeas et al., 1996).

Στη φύση η ωοτοκία του λαβρακιού παρατηρείται από το Νοέμβριο έως το Μάρτιο στη Μεσόγειο θάλασσα. Στις εντατικές καλλιέργειες τους η ωοτοκία πραγματοποιείται αβίαστα. Είναι δυνατή όμως η χρήση ορμονών σε ακραίες περιπτώσεις όπως της ορμόνης GnRHα 10 μg / kg του σωματικού βάρους για πολλαπλή αναπαραγωγή και υψηλότερη ποιότητα των αυγών ανά 7 με 14 μέρες (Mylonas et al., 2003).

1.2.2. ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερύγιων, στην υπερτάξη των Ακανθοπτερύγιων, στην τάξη Perciformes και στην οικογένεια Sparidae.

Απαντάται στη Μεσόγειο, τη Μαύρη θάλασσα και στον Ατλαντικό ωκεανό από το νότο των βρετανικών νήσων ως τη Σενεγάλη (Tortonese, 1984). Συχνάζει σε παράκτιες θαλάσσιες περιοχές και κινείται στα βαθύτερα νερά πραγματοποιώντας την ωοτοκία κατά το φθινόπωρο και το χειμώνα (Ben-Tuvia, 1985). Τα ενήλικα άτομα επιστρέφουν στις περιοχές με ρηχά νερά μετά την ωοτοκία και αργότερα ενώνονται με τα νέα ιχθύδια, τα οποία παραμένουν στην περιοχή ως την σεξουαλική τους ωρίμανση (Ben-Tuvia, 1985). Τρέφονται στην φύση με καρκινοειδή και οστρακοειδή σε αμμώδεις πυθμένες.



Εικόνα 1.4.: Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Το σώμα της τσιπούρας έχει ωοειδές σχήμα και είναι συμπιεσμένο στα πλευρά. Το σώμα της έχει χρώμα γκρι ασημί με μια μεγάλη μαύρη κηλίδα, στην αρχή της πλευρικής γραμμής πάνω στο βραγχιακό επικάλυμμα.

Η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από πρωτανδρικό ερμαφροδιτισμό για αυτό τα αρσενικά επικρατούν αριθμητικά σε άτομα μήκους 10 – 17 cm. Η αναστροφή φύλου πραγμα-

τοποιοίται μεταξύ μήκους 15 cm – 27 cm. Οι ιχθύς άνω των 33 cm είναι θηλυκοί σε δειγματοληψία πειράματος (Mehanna, 2007). Το 50% των ατόμων ωριμάζουν σεξουαλικά στην ηλικία των τεσσάρων ετών (Kraljevic & Dulcic, 1997). Έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής. Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ατόμων ηλικίας 11 ετών. Έχουν καταγραφεί διαφορές στο ρυθμό αύξησης βάρους και στην ηλικία ωρίμανσης στην φύση ανάλογα με την περιοχή, οι οποίες οφείλονται στις κλιματικές αλλαγές και στις διαφορετικές τροφές (Kraljevic & Dulcic, 1997).

Η εκτροφή της τσιπούρας πραγματοποιείται σε δεξαμενές, σε ιχθυοκλωβούς και σε χωμάτινες δεξαμενές θαλασσινού νερού. Το εμπορεύσιμο μέγεθος είναι 250-400 g και επιτυγχάνεται σε 12-18 μήνες χάριν στα βελτιωμένα σιτηρέσια και τις τεχνολογικές μεθόδους εκτροφής οι οποίες μείωσαν τη χρονική περίοδο εκτροφής (Abusdeg, 2004).

Σε δείγμα 1.714 ατόμων τσιπούρας τα όποια συλλέχθηκαν από το Port Said, το βάρος των ιχθύων σε σχέση με την ηλικία ήταν 128,91 g, 290,44 g, 455,34 g και 548,77 g για το 1^ο, 2^ο, 3^ο και 4^ο έτος της ηλικίας τους αντίστοιχα, αυξάνοντας το συντελεστή αύξησης βάρους σε σχέση με το χρόνο. Το μήκος των ιχθύων σε σχέση με την ηλικία ήταν 21,26 cm, 27,80 cm, 32,25 cm και 34,30 cm για το 1^ο, 2^ο, 3^ο και 4^ο έτος της ηλικίας τους αντίστοιχα (Mehanna, 2007).

1.3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΕΨΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

1.3.1. Ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας και του λαβρακιού

Τα όργανα στα οποία πραγματοποιείται η πέψη είναι ο οισοφάγος, το στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο. Υποστηρικτικά στην όλη διαδικασία της πέψης λειτουργούν το πάγκρεας, η χολή και το συκώτι (Nikolopoulou, 2008).

Η ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος στο λαβράκι έχει μελετηθεί με τεχνικές μικροσκοπίας (Garcia Hernandez et al., 2001), όπου τα νεοεκολευθέντα λαυράκια εμφανίζουν ένα ευθύ γαστρεντερικό σωλήνα που επικαλύπτεται από λείους μύες κατά μήκος του λεκιθικού σάκου. Η ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα μετά την εκκόλαψη μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις. Η πρώτη φάση ξεκινά από την εκκόλαψη και μέχρι το άνοιγμα του στόματος κατά την 6^η - 7^η ημέρα σε θερμοκρασία 14 °C – 16 °C. Σε αυτό το διάστημα το πεπτικό σύστημα διακρίνεται σε έξι τμήματα: το στοματοφάρυγγα, τον οισοφάγο, το στομάχι, το πρόσθιο, το κυρίως και το οπίσθιο έντερο (Giffard-Mena et al, 2006). Το επιθήλιο είναι απλό και στρωματοποιημένο στην οπίσθια περιοχή του εντέρου. Τα κύτταρα του επιθηλίου είναι μεγάλου ύψους στο οπίσθιο τμήμα όπως και ο αριθμός και το ύψος της κορυφής μικρολαχνών και το μέγεθος πεταλιωδών δομών. Επίσης οι βλεφαρίδες είναι μεγαλύτερες σε αριθμό στο οπίσθιο τμήμα από ότι είναι στον υπόλοιπο

γαστρεντερικό σωλήνα (Garcia Hernandez et al., 2001). Σε αυτό το στάδιο η διατροφή εξαρτάται αποκλειστικά από το λεκιθικό σάκο (ενδοτροφική περίοδος).

Η δεύτερη φάση ξεκινά από το άνοιγμα του στόματος έως την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου (6^η -7^η έως 13^η -15^η ημέρα). Κατά τη φάση αυτή, ο οισοφάγος, η περιοχή του στομάχου, το κυρίως και το οπίσθιο έντερο γίνονται πιο διακριτά. Η βαλβίδα η οποία χωρίζει το κυρίως από το οπίσθιο έντερο, σχηματίζεται από συνδετικό ιστό καλυμμένο με κυλινδρικό επιθήλιο. Το επιθήλιο έχει στρωματοποιηθεί στον οισοφάγο και εμφανίζονται τα κυπελοειδή κύτταρα, τα οποία περιέχουν όξινες και θεικές βλεννώδεις εκκρίσεις. Στα επιθηλιακά κύτταρα του οπισθίου εντέρου παρατηρούνται ενδοσώματα, ενδεικτικά της πέψης και της απορρόφησης των πρωτεϊνών (Garcia Hernandez et al., 2001).

Η τρίτη φάση ξεκινά από την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου έως την πρώτη εμφάνιση του στομάχου (13^η - 15^η έως 55^η ημέρα). Σχηματίζονται 2-3 πυλωρικά τυφλά, τα επιθηλιακά κύτταρα των οποίων αποκτούν το χαρακτήρα των ώριμων απορροφητικών κυττάρων. Γύρω στην 29^η ημέρα τίθεται σε λειτουργία η κυτταρική μεταφορά ιόντων με τη βοήθεια Na⁺/K⁺-ATPase στο στόμα και στον οισοφάγο (Giffard-Mena et al, 2006). Τα κυπελοειδή κύτταρα περιέχουν ουδέτερο pH βλεννώδων εκκρίσεων και αυξάνονται σε αριθμό στο έντερο. Αυτά τα κύτταρα εμφανίζονται επίσης και στη γαστρική περιοχή.

Τέλος, η τέταρτη φάση (μετά την 55^η ημέρα) ξεκινά με την εμφάνιση του πρώτου γαστρικού αδένος, την αύξηση της λειτουργίας της επιφανειακής εντερικής απορρόφησης, το σχηματισμό νέων πυλωρικών τυφλών και δύο εντερικών περιελίξεων. Έτσι το στομάχι αποκτά την οριστική ιστολογική και ανατομική εμφάνιση, με τα αδενικά κύτταρα να έχουν τον υπερδομημένο χαρακτήρα των κυττάρων που εκκρίνουν τόση πεψίνη όσο και υδροχλωρικό οξύ (Garcia Hernandez et al., 2001).

Η αναπτυξιακή διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων του παγκρέατος δεν εξαρτάται από τις συνθήκες εκτροφής και φαίνεται να είναι γενετικά προγραμματισμένη μέχρι τη στιγμή του ανοίγματος του στόματος. Η δραστηριότητα του εξωκρινούς παγκρέατος κατά τη διάρκεια της περιόδου των νυμφών και των ιχθυδίων φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από τις διατροφικές συνθήκες (Beccaria et al., 1991).

Η έλλειψη μορφολογικά και λειτουργικά στομάχου στα νεοεκκολευθέντα ιχθύδια αποτελεί ένα ανασταλτικό παράγοντα στην αξιοποίηση των σύνθετων σιτηρεσίων στις πρώτες 2 - 3 εβδομάδες της ζωής τους, δεδομένου ότι η παρουσία των πεπτικών ενζύμων είναι περιορισμένη (Nolting et al., 1999).

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός βενθικών ασπόνδυλων στο στομάχι λαβρακίων σε διάφορα εκβολικά συστήματα της Ολλανδίας και του Βελγίου, ανέδειξε μεγάλη ποικιλία οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των *C. volutator*, *N. diversicolor*, *Crangon crangon*, *Carcinus maenas* και *Orchestia* spp.. Η ποικιλία των οργανισμών διέφερε ανάλογα με το έλος παρόλο που δεν υπήρχε σταθερό διατροφικό μοτίβο, αντικατοπτρίζοντας τον

καιροσκοπικό χαρακτήρα της διατροφής αυτού του αρπακτικού ιχθύος (Hampel et al., 2005).

1.3.2. Πεπτικά ένζυμα τσιπούρας και λαβρακιού

Οι ονομασίες όλων των ενζύμων προέρχονται από τη λειτουργία που εκτελούν ή από τον τύπο των οργανικών σύνθετων στα οποία δρουν (Πινάκας 1.1.).

Στο λαβράκι, τα πεπτικά ένζυμα εμφανίζονται σταδιακά κατά την ανάπτυξη όπως κατέδειξε και μελέτη από την πρώτη ημέρα της εκκόλαψης έως την 40η ημέρα μετά την εκκόλαψη (Zambonino Infante & Cahu, 1994). Η δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων αυξάνει μεταξύ της 4ης - 6ης ημέρας. Αυτή η αύξηση συμπίπτει με το άνοιγμα του στόματος και είναι ανεξάρτητη από την πρόσληψη του σιτηρεσίου, δεδομένου ότι μέχρι την 6η ημέρα τα λεκιθοφόρα ιχθύδια δεν σιτίζονται, δηλαδή είναι γενετικά προγραμματισμένο. Μετά από 12η ημέρα όλα τα πεπτικά ένζυμα εκτός από τη θρυψίνη είχαν μια σταθερή μεταβολή. Μείωση της δραστικότητας τους παρατηρήθηκε την 23η ημέρα, που ακολουθήθηκε από σταθερή δραστικότητα έως την 40η ημέρα (Zambonino Infante & Cahu, 1994).

Η μεταγραφή της θρυψίνης δεν επηρεάζεται από το ποσοστό της διατροφικής πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο. Η ποσότητα και η σύνθεση του σιτηρεσίου επηρεάζει τη δραστικότητα της αμυλάσης καθώς επηρεάζει τους μοριακούς μηχανισμούς της αμυλάσης (Peres et al., 1998).

Η απόκριση της δραστικότητας των πεπτικών ενζύμων στην αλλαγή της διαίτας μελετήθηκε μετά την 26η ημέρα στο λαβράκι. Η διατροφή με σύνθετα σιτηρέσια οδήγησε σε υψηλότερες ενζυμικές δραστικότητες. Η δραστικότητα της αμυλάσης αυξήθηκε στο σύνθετο σιτηρέσιο σε σχέση με τα άτομα που σιτίστηκαν με ζωντανή τροφή, αποκρινόμενη στην περιεκτικότητα 12 % αμύλου του σύνθετου σιτηρεσίου. Η δραστικότητα της θρυψίνης ήταν όμοια και στους δύο τύπους τροφής γεγονός που πιθανώς οφείλεται στο ότι οι διαφορές στην περιεκτικότητα διατροφικών πρωτεϊνών στους δύο τύπους τροφής ισορροπούνται με περαιτέρω πέψη (Zambonino Infante & Cahu, 1994).

Στην τσιπούρα, η δραστικότητα της πεψίνης ανιχνεύτηκε μόνο στο στομάχι. Η δραστικότητα της θρυψίνης ήταν σημαντικά χαμηλή στο στομάχι σε σχέση με τα τμήματα του εντέρου. Δεν υπήρχαν διαφορές στη δραστικότητα της χυμοθρυψίνης μεταξύ των διαφόρων τμημάτων του εντέρου. Η δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α του προσθίου εντέρου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από ότι στα πυλωρικά τυφλά. Η δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β στα πυλωρικά τυφλά ήταν μεγαλύτερη από αυτήν του οπισθίου εντέρου, αλλά όχι μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα τμήματα (Psohiou et al., 2007). Η δραστικότητα της αμυλάσης ήταν περίπου ίδια σε όλα τα τμήματα του εντέρου και ήταν μικρότερη στο στομάχι (Deguara et al., 2003).

Τα ένζυμα που δρουν στην επιφάνεια της μεμβράνης του εντερικού βλεννογόνου συχνά έχουν υδρολυτική και μεταφορική λειτουργία στο λαβράκι. Το ένζυμο γ-γλουταμυλική

Πινάκας 1.1. Γενικά χαρακτηριστικά των κυριοτέρων πεπτικών ενζύμων των ιχθύων
(Bakke et al., 2011)

Περιοχή σύνθεσης	Ένζυμο	Υπόστρωμα	Εξειδίκευση / Τελικό προϊόν
Στομάχι	Πεψίνη (Πεψινογόνο)	Πρωτεΐνες και πολυπεπίδια	Πεπτιδικοί δεσμοί σε αρωματικά αμινοξέα
Πάγκρεας	Θρυψίνη (θρυψινογόνο)	Πρωτεΐνες και πολυπεπίδια	Πεπτιδικοί δεσμοί σε Αργινίνη ή Λυσίνη
	Χυμοθρυψίνη (χυμοθρυψινογόνο)	Πρωτεΐνες και πολυπεπίδια	Πεπτιδικοί δεσμοί σε αρωματικά αμινοξέα
	Ελαστάση (Προελαστάση)	Ελαστίνη και άλλες πρωτεΐνες	Πεπτιδικοί δεσμοί σε αλιφατικά αμινοξέα
	Καρβοξυπεπτιδάση Α (Προκαρβοξυπεπτιδάση Α)	Πρωτεΐνες και πολυπεπίδια	Καρβοξυτελικό αμινοξύ με αρωματικές ή αλιφατικές πλευρικές
	Καρβοξυπεπτιδάση Β (Προκαρβοξυπεπτιδάση Β)	Πρωτεΐνες και πολυπεπίδια	Καρβοξυτελικό αμινοξύ με αλκαλική πλευρική ομάδα
	Συνλιπάση (Προ-συνλιπάση)	Σταγονίδια λίπους	Λειτουργεί σαν άγκυρα για την λιπάση
	Παγκρεατική λιπάση	Τριγλυκερίδια	Μονογλυκερίδια και λιπαρά οξέα
	Πάγκρεατική α-αμυλάση	Άμυλο	1,4,α-γλυκοζιτικός δεσμός, παράγει δεξτρίνη, μαλτοτρίοζη, Μαλτόζη
	Ριβονουκλεάση	RNA	Νουκλεοτίδια
	Δεοξυριβονουκλεάση	DNA	Νουκλεοτίδια
	Φωσφολιπάση Α (Προφωσφολιπάση Α)	Φωσφολιπίδια	Φωσφολιπίδια, λυσοφωσφολιπίδια
	Εντεροκινάση	Θρυψινογόνο	Θρυψίνη
	Αμινοπεπτιδάση	Πολυπεπίδια	Αμινοτελικό αμινοξύ
	Διπεπτιδάση	Διπεπίδια	Δύο αμινοξέα
	Γλυκοαμυλάση	Μαλτόζη, μαλτοτρίοζη	Γλυκόζη
Εντερικό επιθήλιο	Διάφορες πεπτιδάσες	Δι, Τρι & Τετραπεπίδια	Αμινοξέα

τρανσπεπτιδάση εκτός από την υδρολυτική λειτουργία, εμπλέκεται στην μεταφορά πεπτιδίων. Η δραστηριότητα του ενζύμου λευκίνη-αμινοπεπτιδάση επηρεάζεται από το είδος και την ποσότητα της διατροφικής πρωτεΐνης. Οι δραστηριότητες της αλκαλικής φωσφατάσης επηρεάζονται από όλα τα φωσφορυλιωμένα υποστρώματα, φωσφολιπίδια και φωσφοπρωτεΐνες. επίσης, είναι ευαίσθητος δείκτης της κατάστασης υποσιτισμού (Zambonino Infante, 1994).

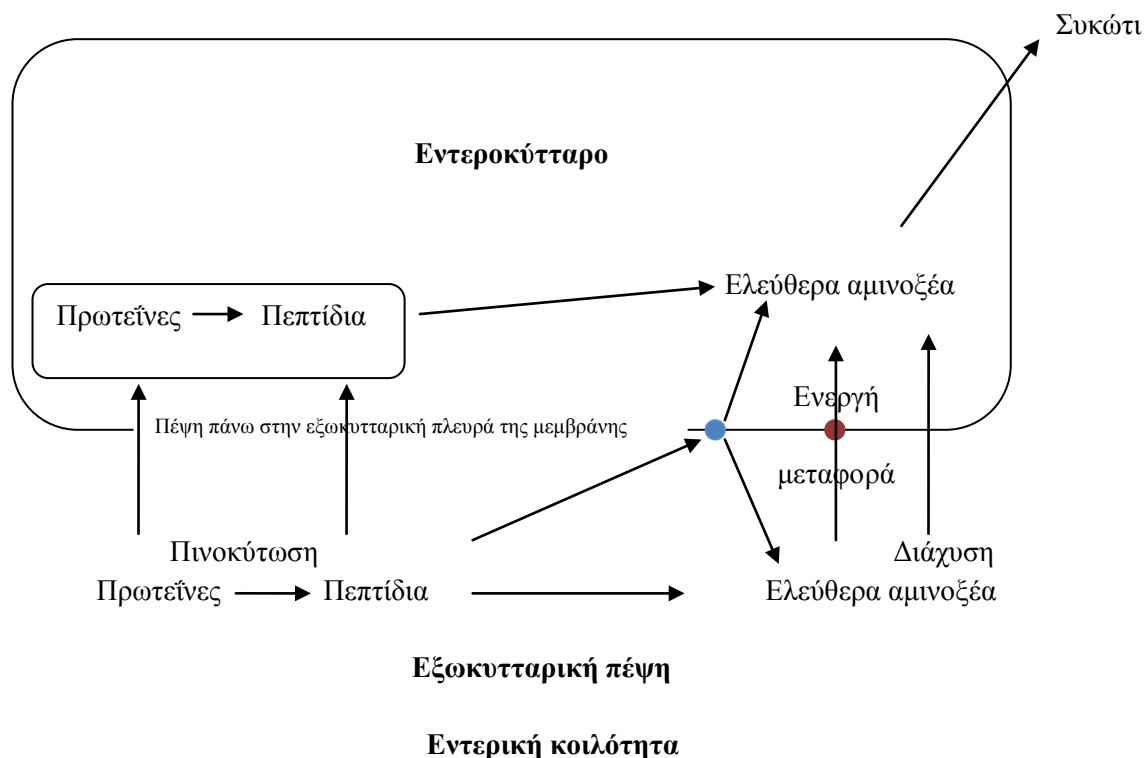
1.3.3. Διαδικασία πέψης στους ιχθύς

Η χρήση διαφορετικών διατροφικών συστατικών, τα οποία είναι αναγκαία για τις φυσιολογικές διεργασίες στους ιχθύς, απαιτεί αρχικά τη διάσπασή τους και κατόπιν την απορρόφησή τους από το έντερο.

Η διαδικασία της πέψης είναι ένας συντονισμένος συνδυασμός φυσικών, χημικών και ενζυματικών δραστηριοτήτων που ξεκινά τη στιγμή της πρόσληψης του σιτηρεσίου στη στοματική κοιλότητα και λήγει όταν αποβάλλονται τα περιττώματα από την έδρα στο οπίσθιο άνοιγμα του εντέρου. Οι φυσικές διεργασίες πέψης συμπεριλαμβάνουν τη διάτριση, σύνθλιψη και ανάμιξη του σιτηρεσίου. Η έκκριση οξέως στο στομάχι είναι μια χημική διαδικασία η οποία βοηθά στην υδρόλυση και διάσπαση χημικών δεσμών. Η ενζυμική διαδικασία πέψης στοχεύει στη μοριακή διάσπαση πρωτεϊνών, λιπών, υδατανθράκων και βασίζεται σε ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων. Τα ένζυμα και η μοριακή πέψη δρουν καθοριστικά στη μεταφορά όλων των τύπων των θρεπτικών συστατικών, από την εντερική κοιλότητα στα βλεννογόνα κύτταρα. Αυτά τα θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, πολυπεπτίδια, αμινοξέα, όλους τους τύπους λιπών, υδατάνθρακες, βιταμίνες, χρωστικές και άλατα.

1.3.3.1. Μηχανική πέψη στους ιχθύς

Η μηχανική επεξεργασία της τροφής αρχίζει στο στόμα όπου το σιτηρέσιο έχει διατρηθεί και συνθλιφτεί με τα δόντια και τη βοήθεια των μάγουλων και των βραγχίων. Επίσης γίνεται φιλτράρισμα, επικέντρωση και τροφοδότηση των μικρών σωματιδίων στα επιθηλιακά κύτταρα του οισοφάγου, το φιλτράρισμα του θαλασσινού νερού γίνεται σε αναλογία 1:1: $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ (Grosell, 2006) . Μόλις μεταφερθεί το σιτηρέσιο στο στομάχι και το έντερο, οι μύες συμβάλλουν στην ανάμιξη του σιτηρεσίου με το υδροχλωρικό οξύ και τα διάφορα πεπτικά ένζυμα. Οι ισχυροί μύες του στομάχου βοηθούν στη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων, της χιτίνης και άλλων δύσπεπτων σωματιδίων. Οι περισταλτικές κινήσεις του πεπτικού συστήματος μεταφέρουν και αναμιγνύουν το υπό διάσπαση σιτηρέσιο κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα έως την έδρα. Αυτή η διαδικασία φέρνει τις θρεπτικές ουσίες σε στενή επαφή με τα πεπτικά ένζυμα τα οποία βρίσκονται στην



Εικόνα 1.5.: Η πέψη των διατροφικών πρωτεϊνών στους ιχθύς ακολουθεί πολλές οδούς ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά (Rust, 2002).

ψυκτροειδή παρυφή του εντερικού βλεννογόνου και στους πεπτικούς χυμούς (Gaertner et al., 1989).

1.3.3.2. Ενζυμική πέψη στους ιχθύς

Τα πεπτικά ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση των θρεπτικών συστατικών των σιτηρεσίων ούτως ώστε να μπορούν να απορροφηθούν από ολόκληρη τη μεμβράνη των ψυκτροειδών παρυφών των εντεροκυττάρων. Αυτά τα ένζυμα μπορεί να εκκρίνονται α) από παγκρεατικά κύτταρα, β) από εξειδικευμένα κύτταρα του στομάχου, γ) στη μεμβράνη του εντερικού βλεννογόνου ή να περιέχονται στο κυτταρόπλασμα των εντερικών κυττάρων. Η πέψη στους ιχθύς ακολουθεί πολλές οδούς, ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά (Εικόνα 1.5.). Τα προϊόντα της εξωκυτταρικής πέψης στην εντερική κοιλότητα, μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων. Οι περισσότερες διατροφικές έρευνες έχουν δώσει μεγαλύτερη βαρύτητα στην εξωκυτταρική πέψη, η οποία λαμβάνει χώρα στην εντερική κοιλότητα και μικρότερη βαρύτητα στην πέψη που πραγματοποιείται στην επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου, ενώ ακόμη λιγότερες είναι οι έρευνες οι οποίες αναφέρονται στην ενδοκυτταρική πέψη (Peres et al., 1998).

Η λειτουργική σημασία αυτών των τρόπων πέψης φαίνεται να αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ιχθύων, όπως επίσης μπορεί να αλλάζει κατά τη φυλογένεση. Γενικά αυτές

οι αλλαγές υποδηλώνουν την ύπαρξη συντονισμού αυτών των τρόπων πέψης με τη γενική φυσιολογική κατάσταση των ιχθύων (Garcia Hernandez et al., 2001).

Πρωτεάσες και πεπτιδάσες

Η πέψη των διατροφικών πρωτεϊνών αρχίζει στο στομάχι και συνεχίζεται στη εντερική κοιλότητα, όπου οι πρωτεΐνες διασπώνται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες με τη βοήθεια των πρωτεασών, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες διασπώνται σε ελεύθερα αμινοξέα με τις πεπτιδάσες, και τα ελεύθερα αμινοξέα απορροφώνται εξωκυτταρικά και μέσω της μεμβράνης (Εικόνα 1.5.). Σε νεαρά άτομα και ενήλικους ιχθύς η απορρόφηση των προϊόντων της πέψης γίνεται με τη λήψη υδατικών σταγονιδίων από την κυτταρική μεμβράνη (πινοκύτωση), με διάχυση και ενεργή μεταφορά στο οπίσθιο έντερο (Abaurrea et al., 1994). Τα πεπτίδια μπορούν να απορροφηθούν απευθείας. Η πορεία της ερευνητικής εξελίξεως έχει αποδείξει ότι η απορρόφηση των μικρών πεπτιδίων είναι μεγαλύτερη από ότι είναι αυτή των αμινοξέων (Gardner, 1984).

Το υδροχλωρικό οξύ και οι πρωτεάσες όπως η πεψίνη στο στομάχι, η θρυψίνη στο έντερο και τα πυλωρικά τυφλά, δρουν σε όλα τα επίπεδα πρωτεϊνικής διαμόρφωσης, ενώ οι πεπτιδάσες διασπούν τους δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων του πεπτιδίου της πρωτοταγούς και της δευτεροταγούς δομής.

Οι πρωτεάσες μπορεί να είναι ενδοπρωτεάσες, οπότε καταλύουν τη διάσπαση της πεπτιδικής αλυσίδας στο μέσον ή εξωπρωτεάσες που αποσπών αμινοξέα από το άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας. Για παράδειγμα οι αμινοπεπτιδάσες είναι εξωπεπτιδάσες οι οποίες αποσπών αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας (Rust, 2002).

Οι πρωτεάσες και άλλα ένζυμα ταξινομούνται βάση του εύρους του pH (όξινο ή ουδέτερο) που είναι ενεργές, των ιστών παραγωγής τους (στομάχι, πάγκρεας, εντερικός βλεννογόνος, βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας), ή της θέσης δράσης (ενδοκυτταρικό, μεμβράνη εντροκυττάρων, εξωκυτταρικό). Ο κύριος ρόλος των εξωκυτταρικών πρωτεασών και των πρωτεασών της μεμβράνης του εντερικού βλεννογόνου είναι η διάσπαση των πεπτόμενων πρωτεϊνών σε αμινοξέα και πεπτίδια, ώστε να καταστούν απορροφήσιμα από την ψυκτροειδή παρυφή των εντεροκυττάρων (Kuzmina, 1997).

Οι πρωτεάσες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού ελευθέρων ζυμογόνων πεπτικών ενζύμων. Κλασσικό παράδειγμα αυτών είναι μια σειρά ενεργοποιήσεων οι οποίες συμβαίνουν με τα ένζυμα του παγκρέατος. Το θρυψινογόνο ενεργοποιείται μετά από πρωτεόλυση που καταλύεται από την εντεροκινάση, μια πρωτεάση ειδική για αυτή την διαδικασία, η οποία ενεργοποιεί τη θρυψίνη η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τα ζυμογόνα άλλων ενζύμων. Τα ένζυμα που ενεργοποιούνται από τη θρυψίνη είναι η χυμοθρυψίνη, η ελαστάση, η κολλαγενάση και η λιπάση (Rust, 2002).

1.4. ΟΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΝΑΓΚΕΣ ΤΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

Η πρωτεΐνη είναι το μείζον συστατικό του σώματος του λαβρακιού, με ποσοστό 20,8 % του ξηρού βάρους του (Eroldogan et al., 2005). Οι ιχθύς καταναλώνουν πρωτεΐνες για την πρόσληψη αμινοξέων, τα οποία απορροφώνται από το έντερο και διανέμονται μέσω του αίματος στα διάφορα όργανα και στους ιστούς όπου χρησιμοποιούνται για την σύνθεση νέων αμινοξέων (Baumrucker et al., 1989). Η τακτική παροχή πρωτεϊνών και αμινοξέων είναι απαραίτητη στη διατροφή των μεσογειακών ιχθύων οι οποίοι χρησιμοποιούν συνεχώς τα αμινοξέα για τη δόμηση νέων πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη, την αύξηση και την αναπαραγωγή ή στο πλαίσιο της ανακύκλωσης των υπαρχόντων πρωτεϊνών (Emre et al., 2008). Η έλλειψη πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την κατάπαυση της αύξησης του βάρους και τη χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών του σώματος για τη συντήρηση κρίσιμων λειτουργιών.

Οι διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αναφέρουν πως το λαβράκι έχει μεγάλες ανάγκες σε διατροφική πρωτεΐνη, η οποία κυμαίνεται από 45 % έως 48 % (Peres & Oliva-Teles, 2005, Πίνακες 1.2. & 1.3.). Το βέλτιστο επίπεδο πρωτεΐνης και αμύλου στα σιτηρέσια για τη μέγιστη αύξηση βάρους και την αποδοτικότητα του σιτηρεσίου είναι 50 % και 15 % αντίστοιχα σε ιχθύδια λαβρακιού (Hidalgo & Alliot, 1988).

Οι ανάγκες συντήρησης του λαβρακιού βάρους 22 g σε ενέργεια και σε πρωτεΐνη υπολογίστηκε σε 56,8 kJ DE / kg / ημέρα και 1,15 g DP / kg / ημέρα αντίστοιχα βάση έμμεσης θερμιδομετρίας και στοιχείων εκκριμένης αμμωνίας (Peres & Oliva-Teles, 2005).

Η κάλυψη των ενεργειακών τους διατροφικών αναγκών γίνεται με τη χρησιμοποίηση των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη καλύπτει το 30 – 34 % του συνολικού ενεργειακού κόστους, το οποίο σε συνθήκες συντήρησης αυξάνεται για να φτάσει το 49-56% (Peres & Oliva-Teles, 2005).

1.5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΕΨΗ

Διάφοροι βιολογικοί, περιβαλλοντικοί (Watanabe et al., 1993) και διατροφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την πέψη, την απορρόφηση και τη χρήση των θρεπτικών συστατικών στους ιχθύς, και έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο συντελεστή μετατρεψιμότητας του σιτηρεσίου, το ρυθμό αύξησης βάρους, την ανάπτυξη και το χρονικό διάστημα για την επίτευξη του τελικού βάρους. Η μελέτη του τρόπου επίδρασης αυτών των παραμέτρων στην πεπτικότητα των διατροφικών συστατικών είναι καθοριστική για τη διαμόρφωση της κατάλληλης μεθοδολογίας προσδιορισμού της πεπτικότητας για την αξιολόγηση των σιτηρεσίων.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες των οποίων θα εξεταστεί επίδρασή τους στο συντελεστή πεπτικότητας είναι οι εξής:

1.5.1 ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Παραδοσιακά ορίζεται ως η ποσότητα (g) των διαλυμένων στοιχείων σε ένα (kg) θαλασσινού νερού, συμπεριλαμβανομένων των οργανικών και μη οργανικών στοιχείων. Στη Μεσόγειο θάλασσα η αλατότητα είναι περίπου 38 ‰. Θεωρείται από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες με επίδραση στη φυσιολογία των ιχθύων (Rubio et al., 2005) συμπεριλαμβανομένης της διαδικασίας της πέψης.

Πράγματι, έχει καταδειχθεί ότι στην πέστροφα η υψηλή αλατότητα μειώνει την απορρόφηση της διατροφικής πρωτεΐνης, της ξηρής ουσίας και της ενέργειας (MacLeod, 1977). Οι πεπτικότητες των υδατανθράκων και της πρωτεΐνης είναι χαμηλότερες σε πέστροφες σε θαλασσινό νερό σε σύγκριση με άλλες σε γλυκό νερό (Aksnes & Opstvedt, 1998). Στο *Salvelinus alpinus* οι πεπτικότητες της πρωτεΐνης και των λιπών είναι χαμηλότερες στο θαλασσινό σε σύγκριση με το γλυκό νερό (Einar Ringø, 1991). Στο σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), η πεπτικότητα του αζώτου είναι 9-10 % μικρότερη σε νεαρά άτομα που προσαρμοστήκαν σε θαλασσινό νερό από ότι σε εκείνα που προσαρμόστηκαν σε γλυκό νερό (Usher, 1990).

Στο βακαλάο (*Gadus morhua*) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην πεπτικότητα της πρωτεΐνης μεταξύ χαμηλής αλατότητας (14 ppt) και θαλασσινού νερού. Αντιθέτως, στο χαμηλό επίπεδο αλατότητας καταγράφηκε μεγάλος συντελεστής αύξησης βάρους και μετατρεψιμότητας του σιτηρεσίου (Dutil et al., 1997). Επίσης, η χαμηλή αλατότητα (10 PSU) δεν είχε σημαντική επίδραση στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (De Silva & Perera, 1984). Ωστόσο, ταχύτερος ρυθμός μετακίνησης του σιτηρεσίου κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα και χαμηλότερη πεπτικότητα της πρωτεΐνης, παρατηρήθηκε σε άτομα *Chanos chanos* σε θαλασσινό νερό σε σχέση με το γλυκό νερό (Ferraris et al, 1986).

Το λαβράκι είναι ευρύαλος ιχθύς, ο οποίος παρουσιάζει ικανοποιητική αύξηση σε διάφορα επίπεδα αλατότητας (Rubio et al., 2005) καθώς η δυνατότητα οσμωρύθμισης αυξάνεται κατά την ανάπτυξη του (Giffard-Mena et al., 2006).

Η αλατότητα επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά την πρόσληψη του σιτηρεσίου στο λαβράκι (Rubio et al., 2005). Σε λαβράκι βάρους 52,4g, η μείωση της αλατότητας από 25 ‰ σε 7 ‰ και από 7 ‰ σε 0 ‰ οδήγησε σε μείωση της πρόσληψης σιτηρεσίου, στην πρώτη περίπτωση κατά 27 % και 43 % στη δεύτερη (Rubio et al., 2005). Όταν τα ίδια λαβράκια είχαν τη δυνατότητα επιλογής τριών διαφορετικών διατροφικών καψουλών με αυξημένη περιεκτικότητα σε ένα θρεπτικό συστατικό (πρωτεΐνη, λίπος και υδατάνθρακες) και ένα τέταρτο με ισορροπημένη περιεκτικότητα σε διατροφικά συστατικά, η πρόσληψη των καψουλών που περιείχαν πρωτεΐνη αυξήθηκε με τη μείωση της αλατότητας έναντι αυτής των καψουλών που περιείχαν υδατάνθρακες η οποία μειώθηκε. Η κατανάλωση του

Πίνακας 1.2.: Σύνοψη των γνωστών διατροφικών αναγκών του λαβρακιού (Kissil et al, 2000)

Πρωτεΐνες	
Συνολικό διατροφικό επίπεδο	
Ατελή Ιχθύδια / Νεαρά άτομα	50–60 %
Ενήλικα άτομα	45–50 %
Απαραίτητα αμινοξέα	
Αργινίνη	3,9 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Λυσίνη	4,8 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Μεθειονίνη + Κυστεΐνη	4,4 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Τρυπτοφάνη	0,5 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Συμπληρωματικά αμινοξέα	
Ιστιδίνη	1,6 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
<u>Ισολευκίνη</u>	2,6 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
<u>Λευκίνη</u>	4,3 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Βαλίνη	2,9 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Φαινυλαλανίνη + Τυροσίνη	2,6 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Θρεονίνη	2,7 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Λίπος	
Σύνολο διατροφικό επίπεδο	15-20 %
<i>n</i>-3 HUFA = EPA + DHA	
Νεαρά άτομα (43-75 ημέρες)	1,0 %
ως το εμπορεύσιμο μέγεθος	1,5-2,7 %
Γεννήτορες	Απαραίτητο
Ενέργεια	
Για συντήρηση (νεαρά άτομα)	40,6 kJ/kg
Για αύξηση	20-23 MJ/kg feed
Βιταμίνες	Οι προτεινόμενες για την πέστροφα από NRC1993
Αναλογία πρωτεΐνης /ενέργειας	Μόνο μερικά δεδομένα διαθέσιμα

Πίνακας 1.3.: Σύνοψη των γνωστών διατροφικών αναγκών της τσιπούρας (Kissil et al, 2000)

Πρωτεΐνες	
Συνολικό διατροφικό επίπεδο	
Ατελή Ιχθύδια / Νεαρά άτομα	50–60 %
Ενήλικα άτομα	45–50 %
Αμινοξέα	
Αργινίνη	<2,6 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Λυσίνη	5,0 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Μεθειονίνη + Κυστεΐνη	4,0 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Τρυπτοφάνη	0,6 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Συμπληρωματικά αμινοξέα	
Ιστιδίνη	1,7 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Ισολευκίνη	2,6 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Λευκίνη	4,5 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Βαλίνη	3,0 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Φαινυλαλανίνη + Τυροσίνη	2,9 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Θρεονίνη	2,8 (% από την διατροφική πρωτεΐνη)
Λίπος	
Σύνολο διατροφικό επίπεδο	12-24 (% ξηρή Artemia)
n-3 HUFA = EPA + DHA	
Ιχθύδια 7-23 mg	2,98 (% Artemia)
Νεαρά άτομα 1-11g	≥ 0,9
Νεαρά άτομα 12-30 g	1
Έως το εμπορεύσιμο μέγεθος	1,5-2,7 (εμπορικά σιτηρέσια τσιπούρας)
Ανήλικα άτομα	0,42 (ελάχιστη επίτευξη βιωσιμότητας 50% αυγών)
Ενέργεια	
Καθημερινές ανάγκες συντήρησης	55,8 KJ.ΣΒ(Kg) ^{-0,83}
Απαιτήσεις αύξησης	23 MJ/kg ΣΒ
Υδατάνθρακες	20
Βιταμίνες mg/kg σιτηρέσιο ----- Πυριδοξίνη (B₆)	3-5
Βιοτίνη	0,37
Νικοτινικό οξύ	63-83
Θειαμίνη (B₁)	>5,0
Ριβοφλαβίνη, Παντοθενικό οξύ, Ασκορβικό οξύ	απαραίτητα (άγνωστη ποσότητα)
Ανόργανες ουσίες	Εμπορικές προμήξεις
Αναλογία πρωτεΐνης /ενέργειας	28-19 εύπεπτη πρωτεΐνη/ MJ ενέργεια (10 g - 500g Σ.Β.)

σιτηρεσίου των λιπών δεν μεταβλήθηκε με τη μείωση της αλατότητας. Σε πείραμα εκτροφής λαβρακιού σε διαφορετικές αλατότητες από 33 - 0 ‰ διάρκειας ενός έτους, ο μέγιστος ρυθμός αύξησης (SGR) και η μέγιστη μετατρεψιμότητα πρωτεϊνών καταγράφηκε σε αλατότητα 30 ‰ (Dendrinos & Thorpe, 1985). Στο ίδιο πείραμα παρατηρήθηκε ολική θνησιμότητα σε αλατότητα 0‰ πριν την ολοκλήρωση του πειράματος (Dendrinos & Thorpe, 1985).

Η επίδραση του διαστήματος της αλατότητας στη διαβίωση των προνυμφών ηλικίας 1-32 ημερών της τσιπούρας (Tandler et al., 1995), εξαρτάται από τους οσμωρυθμιστικούς μηχανισμούς των υγρών του σώματος τους σε φυσιολογικά επίπεδα και από την αλληλεπίδραση άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία με αποτέλεσμα να πετυχαίνουν την καλύτερη ανάπτυξη στις κατάλληλες αλατότητες για αυτές.

Η επιδερμίδα, ο πεπτικός σωλήνας και τα βράγχια είναι τα κυριότερα οσμωρυθμιστικά όργανα. Επειδή η οσμωρύθμιση είναι μια μεταβολική διαδικασία η οποία βασίζεται στην ενεργή μεταφορά ιόντων για τη διατήρηση της συγκέντρωσης των εσωτερικών αλάτων, θεωρείται ότι η ενέργεια που καταναλώνεται δρα ανασταλτικά στο ρυθμό αύξησης (Eroldogan et al., 2004). Σε συνθήκες ανάπαυσης, ο ρυθμός του μεταβολισμού μειώνεται με την μείωση της αλατότητας, γεγονός που υποδηλώνει μείωση του μεταβολικού κόστους. Στο μοντέλο του Fry, ο οποίος ταξινομεί τους περιβαλλοντικούς παράγοντες σύμφωνα με τις επιδράσεις τους στη φυσιολογία των ιχθύων, η αλατότητα θεωρείται ένας κρυφός παράγοντας, όπου διοχετεύεται ένα μέρος της ενέργειας που είναι διαθέσιμη για τις μηχανικές, φυσιολογικές ρυθμίσεις του οργανισμού (Claireaux & Lagardere, 1999).

Επίσης, η διατήρηση σταθερής εσωτερικής συγκέντρωσης αλάτων απαιτεί την κατάποση νερού, ο ρυθμός της οποίας διαφοροποιείται με την αλατότητα. Στο λαβράκι, ο ρυθμός κατάποσης νερού σε διαφορετικές αλατότητες επηρεάζεται από την ηλικία και το αναπτυξιακό στάδιο (Varsamos et al., 2004). Έτσι, έχει παρατηρηθεί πως στις προνύμφες λαβρακιού ο ρυθμός της κατάποσης νερού (DR_{bw}) δε διαφοροποιείται με την αλλαγή της αλατότητας, ενώ αντίθετα ο ρυθμός κατάποσης διαφοροποιείται σε υποσμωτικές και υπεροσμωτικές συνθήκες σε ατελή ιχθύδια και νεαρά άτομα λαβρακιού, καθώς πίνουν λιγότερο σε υποσμωτικές συνθήκες από ότι σε υπεροσμωτικές συνθήκες. Γενικά τα λεκιθοφόρα ιχθύδια πίνουν περισσότερο από τα ατελή ιχθύδια και τα νεαρά άτομα (Varsamos et al., 2004).

Σε ιχθύδια τσιπούρας ο ρυθμός κατάποσης νερού μειώνεται με τη μείωση της αλατότητας και επηρεάζεται από το περιβαλλοντολογικό ασβέστιο (Guerreiro et al, 2004). Η ένταση της μεταφοράς ιόντων από τη μεμβράνη του πλάσματος μέσω του $Na^+/K^+-ATPase$ ανταλλάκτη στα διάφορα τμήματα του εντέρου είναι μεγαλύτερη σε θαλασσινό νερό από ότι σε αραιωμένο θαλασσινό νερό. Οι επιδράσεις της αλατότητας στην ανάπτυξη του λαβρακιού

δεν σχετίζονται μόνο με τη συγκέντρωση των συνολικών διαλυμένων ουσιών, αλλά και με τα ενεργά δισθενή ιόντα (Ca_2C και Mg_2C) (Boge et al, 1993).

Τα υγρά του εντέρου στους περισσότερους τελεοστέους ιχθείς είναι αλκαλικά (pH 8,4 – 9,0) και περιέχουν υψηλά επίπεδα HCO_3^- (40 mM–130 mM). Αυτά τα υγρά δεν εμπλέκονται στη ρύθμιση της ουδετερότητας του στομάχου, άλλα αυξάνονται παράλληλα με την αύξηση του ρυθμού κατάποσης νερού σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας, διαδραματίζοντας ένα ρόλο στην οσμωρύθμιση (Wilson et al., 2002).

Τα σιτηρέσια μπορεί να είναι σημαντική πηγή αλάτων σε ευρύαλους ιχθύες, οι οποίοι αναπτύσσονται καλύτερα σε χαμηλά επίπεδα αλατότητας όταν τους προσθέσουμε άλατα μέσα στο σιτηρέσιο όπως NaCl (Eroldogan et al., 2005).

Η αύξηση σε διάφορα επίπεδα αλατότητας δεν είναι απαραίτητο να αντικατοπτρίζει το κόστος της οσμωρύθμισης σε αυτά τα επίπεδα, αλλά εξαρτάται και από τις διαστάσεις των μη οσμωρυθμιζομένων επιδράσεων στο μεταβολισμό.

1.5.2 pH

Όπως σε όλα τα ένζυμα, η δραστηριότητα των περισσότερων πεπτικών ενζύμων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Για το κάθε ένζυμο υπάρχει ένα βέλτιστο pH όπου η δραστηριότητα του είναι η μέγιστη και ένα εύρος pH στο οποίο διατηρείται η δραστηριότητα του (Grosell et al., 1999). Οι αυξομειώσεις του pH οδηγούν σε σημαντικές και άμεσες αλλαγές της δραστηριότητας των πεπτικών ενζύμων που μπορούν να φτάσουν και σε μείωση της δραστηριότητας έως 50 %. Αυτό προφανώς έχει σημαντική επίδραση στη διαδικασία της πέψης των ιχθύων (Deguara et al., 2003).

Αυξομειώσεις του pH σε κάθε τμήμα του πεπτικού συστήματος έχουν παρατηρηθεί σε σχέση με το χρόνο από την πρόσληψη του σιτηρεσίου και για διάστημα έως και 32 ωρών (Deguara et al., 2003) στην τσιπούρα. Σε δειγματοληψίες μετά από 2 έως και 32 ώρες από την πρόσληψη του σιτηρεσίου, το pH στο γαστρεντερικό τμήμα του λαβρακιού επηρεάζεται σημαντικά σε σχέση με το χρόνο. Το pH αυξάνεται απότομα με την είσοδο του σιτηρεσίου στο πρόσθιο έντερο σε σχέση με την τσιπούρα και αυξάνεται περαιτέρω στο κυρίως και στο οπίσθιο έντερο του λαβρακιού (Nikolopoulou, 2010).

Στην πρώτη καταγραφή της Alliot et al (1974) της κατανομής των πρωτεασών που εκκρίνονται στο πεπτικό σύστημα του λαβρακιού, διαπιστώθηκε ότι τις πρώτες ώρες μετά από την κατάποση, το pH του γαστρικού χυμού ήταν γύρω 2, στα πυλωρικά τυφλά ήταν σχεδόν 7, το οποίο όλο και περισσότερο καθίστατο αλκαλικό προς την οπίσθια περιοχή του πεπτικού συστήματος, φθάνοντας στο 7,6 με 8. Μετά από 48 ώρες από το γεύμα, στο στομάχι το pH ήταν μεταξύ 6 και 7, στα πυλωρικά τυφλά και στο εντερικό υγρό ήταν περίπου 8. Οι χημικές εκκρίσεις του πεπτικού συστήματος, όπως οι διττανθρακικές εκκρίσεις, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά μήκος του εντέρου, διαφοροποιούν την τιμή του

pH του προσλαμβανομένου νερού, σε επίπεδα κατάλληλα για τα διάφορα πεπτικά ένζυμα ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δραστηριότητα για την πραγματοποίηση της πέψης των διαφόρων διατροφικών συστατικών στο κατάλληλο εύρος pH (Wilson et al., 1996, 2002). Επίσης σε μικρότερο βαθμό οι διατροφικές συνήθειες των διαφόρων ιχθύων, το μέγεθος του σιτηρεσίου, η περιβαλλοντολογική θερμοκρασία και η περιβαλλοντολογική αλατότητα είναι οι πρόσθετοι παράγοντες στην τροποποίηση των διαφορών στο βαθμό pH του πεπτικού συστήματος (Deguara et al., 2003).

1.5.3. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Το λαβράκι με την τσιπούρα εντάσσονται στους ιχθύες θερμών υδάτων και είναι ευρύθερμα είδη. Το κατάλληλο εύρος θερμοκρασίας για ανάπτυξη του λαβρακιού είναι μεταξύ 14 °C και 28 °C. Η θερμοκρασία η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση είναι 7 °C – 30 °C (Nikolopoulou, 2008). Οι ιχθύες είναι ζώα ποικιλόθερμα, δηλ. Η θερμοκρασία του σώματος διαμορφώνεται σε σχέση με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Αντίστοιχα, προσαρμόζουν την πρόσληψη του σιτηρεσίου ώστε να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες για την εκάστοτε θερμοκρασία (Peres & Oliva-Teles, 1999). Το κατάλληλο εύρος θερμοκρασίας είναι εκείνο στο οποίο υπάρχει πρόσληψη τροφής και δεν παρατηρείται αφύσικη συμπεριφορά η οποία να συνδέεται με θερμικό Stress. Διάφορα πειράματα έχουν γίνει για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην φυσιολογία του λαβρακιού και της τσιπούρας. Από αυτά αναφέρονται τα ακόλουθα:

Στην τσιπούρα μειώθηκε ο ρυθμός της γαστρικής εκκένωσης μετά από μείωση της θερμοκρασίας από 25 °C σε 20 °C σε 15 °C, η οποία συνοδεύτηκε από παρατεταμένη απορρόφηση του διατροφικού λίπους (Santull, 1993). Στο λαβράκι η τροφοληψία μειώνεται σημαντικά στους 10 °C και σταματά στους 7 °C (Hampel et al., 2005).

Στους μεσογειακούς ιχθύες, η τροφοληψία μειώνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού του μεταβολισμού. Έτσι ο ρυθμός του μεταβολισμού (SMR) στο λαβράκι μειώθηκε από 91 σε 89 σε 65 σε 36 mg O₂ / kg / h, με την εκάστοτε μείωση της θερμοκρασίας από 25 °C σε 20 °C σε 15 °C σε 10 °C (Claireaux & Lagardere, 1999).

Στο λαβράκι ο ρυθμός πρόσληψης του σιτηρεσίου μεταβάλλεται θετικά με την θερμοκρασία. Ο ιδανικός ρυθμός για λαβράκια βάρους 20 - 30 g ήταν 1,7 % και 1,2 % του σωματικού βάρους σε θερμοκρασίες 20 °C και 15 °C αντίστοιχα. Η αύξηση της θερμοκρασίας βελτίωσε το συντελεστή αύξησης βάρους και τη μετατρεψιμότητα του σιτηρεσίου, άλλα όχι τη μετατρεψιμότητα της πρωτεΐνης (Hidalgo et al., 1987). Σε θερμοκρασία 15 °C οι ημερήσιες ανάγκες σε πρωτεΐνη και η πρόσληψη του σιτηρεσίου ήταν λιγότερες από ότι ήταν 20 °C (Hidalgo & Alliot, 1988).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην πεπτικότητα του λαβρακιού έχει μελετηθεί *in vivo* όπου παρατηρήθηκε στατιστικά μεγαλύτερη επίδραση σε θερμοκρασία 25 °C από ότι σε 18 °C. Οι αλλαγές στην πεπτικότητα δεν επηρεάστηκαν από το επίπεδο της διατροφικής πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο σε πειραματική περίοδο 12 εβδομάδων (Peres & Oliva-Teles, 1999). Επιπροσθέτως η αύξηση της θερμοκρασίας βοήθησε στην επίτευξη καλύτερου ρυθμού αύξησης και μεγαλύτερης μετατρεψιμότητας του σιτηρεσίου με περιεκτικότητα 48 % σε πρωτεΐνη. Η εκμετάλλευση της διατροφικής πρωτεΐνης ήταν καλύτερη στους 25 °C από ότι στους 18 °C (Peres & Oliva-Teles, 1999).

Από μερικές μελέτες οι οποίες έχουν γίνει σε άλλα είδη για τον προσδιορισμό της επίδρασης της θερμοκρασίας στην πεπτικότητα *in vivo*, έχει διαπιστωθεί ότι η πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, του λίπους και των υδατανθράκων στην πέστροφα είναι μικρότερη στους 7 °C από ότι στους 11 °C και στους 15 °C σε νεαρά άτομα βάρους 18g άλλα όχι σε μεγάλους ιχθύες βάρους 207g έως 586g αυτού του είδους (Windell, 1978). Η πεπτικότητα της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερη στην πέστροφα στους 18 °C από ότι στους 9°C έως 15 °C (Cho & Slinger, 1979). Πιο πρόσφατα (Azevedo et al., 1998) διαπιστώθηκε ότι η πεπτικότητα της πρωτεΐνης, των υδατανθράκων και της ξηρής ουσίας σε πειραματικό σιτηρέσιο πέστροφας, μειώνεται όταν η θερμοκρασία μειώνεται από 15 °C σε 12 °C σε 9 °C σε 6 °C ($P < 0,05$). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και οι Choubert et al. (1982), καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 10 °C στους 18 °C αυξήθηκε η πεπτικότητα της ξηρής ουσίας, της πρωτεΐνης και των υδατανθράκων στην πέστροφα. Άλλες μελέτες, όπου χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό σύστημα συλλογής περιττωμάτων στην πέστροφα, επίσης απέδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 5 °C στους 15 °C αυξάνει το φαινομενικό συντελεστή πεπτικότητας των υδατανθράκων και της πρωτεΐνης (Watanabe, 1996).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τους Cho και Kaushik (1990) οι οποίοι δε διαπίστωσαν καμία επίδραση της θερμοκρασίας στη φαινομενική πεπτικότητα της πρωτεΐνης, των λιπών και των υδατανθράκων στην πέστροφα μεταξύ 5 °C και 15 °C. Αντίστοιχα, η θερμοκρασία του νερού δεν επέδρασε στην πεπτικότητα της πρωτεΐνης στο *Piaractus mesopotamicus* (Carneiro, 1994).

Διαφοροποιημένοι συντελεστές πεπτικότητας και διατροφικής αξίας διαπιστώθηκαν σε διάφορες πηγές λιπών με διαφορετικό προφίλ αμινοξέων σε σχέση με την θερμοκρασία. Ιχθυέλαια και φυτικά έλαια (σιναπόσπορος, σόγια και λιναρόσπορος) παρουσίασαν υψηλές πεπτικότητες (φαινομενικός συντελεστής πεπτικότητας ADC, 80-95%) σε θερμοκρασίες από 5°C έως 15°C (Cho & Kaushik, 1990).

Ο φαινομενικός συντελεστής πεπτικότητας του χοιρινού λίπους και στέατος (λίπη με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα) επηρεάζεται από τη θερμοκρασία σε μικρότερο βαθμό από ότι των ελαίων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ

του σημείου τήξης των λιπαρών οξέων και της θερμοκρασίας του νερού στο φαινομενικό συντελεστή πεπτικότητας. Ο φαινομενικός συντελεστής πεπτικότητας του χοιρινού λίπους και στέατος είναι μικρός σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε αντίθεση με την έλλειψη επίδρασης σε έλαια χαμηλών σημείων τήξης (Bureau et al., 2002).

Το διάστημα της θερμοκρασίας για την επιβίωση και την ανάπτυξη των ιχθύων μπορεί να μεταβάλλεται με την αλατότητα. Αυτό οφείλεται στην επίδραση της αλατότητας στην ωσμωτική ρύθμιση (Beamish, 1970).

Ο όγκος, το χρώμα και το σχήμα της δεξαμενής, η φωτοπερίοδος, το σύστημα ανανέωσης του οξυγόνου και του νερού, η πυκνότητα των ιχθύων στις δεξαμενές εκτροφής, η ύλη από την οποία έχει κατασκευαστεί η δεξαμενή, η χρήση αυτόματης σίτισης, είναι άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσιολογικές επιδόσεις των ιχθύων.

1.5.4. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους επεξεργασίας των σιτηρεσίων, η οποία ταξινομείται ως διατροφικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την πεπτικότητα, είναι η ζελατινοποίηση του αμύλου με τη διαδικασία της εξώθησης κατά την οποία αυξάνει το πορώδες των σύμπηκτων μέσω της επέκτασης της δομής του αμύλου, με αποτέλεσμα την αύξηση της πεπτικότητας του αμύλου σε πολλά είδη ιχθύων (Glencross et al., 2007). Εξίσου διαδεδομένη μέθοδος η οποία επηρεάζει την πεπτικότητα είναι η θερμική επεξεργασία της σόγιας με τη διαδικασία της εξώθησης. Αυτή αδρανοποιεί τους αναστολείς της θρυψίνης οι οποίοι μειώνουν την πεπτικότητα των αμινοξέων και της πρωτεΐνης, χωρίς στατιστικές διαφορές μεταξύ σιτηρεσίων τα οποία περιείχαν σόγια πριν την εξώθηση και αυτών μετά την εξώθηση. Σε αλληλεπίδραση με το ποσοστό της εξωθημένης σόγιας στο σιτηρέσιο και το βαθμό εξώθησης υπήρχαν στατιστικές διαφορές μόνο στην πεπτικότητα των υδατανθράκων (Venou et al., 2006).

Άλλος διατροφικός παράγοντας είναι η προσθήκη της μικροβιακής φυτάσης στο σιτηρέσιο η οποία βελτιώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του φυτικού φωσφόρου στο γατόψαρο (Jackson Scott et al., 1996).

Η ημερήσια χορηγούμενη ποσότητα σιτηρεσίου (Windell et al., 1978), η αλλαγή της διαίτας από ζωντανή τροφή σε σύμπηκτα σιτηρεσίων κατά τα πρώτα στάδια της ηλικίας των ιχθύων (Zambonino Infante & Cahu, 1997), το επίπεδο των υδατανθράκων στο σιτηρέσιο (Krogdahl et al, 2003), ο βαθμός μίξης του σιτηρεσίου (Axe, 1995) και η λείανση και η θερμική επεξεργασία του με ατμό (Booth, 2000), η προσθήκη εξωγενών ενζύμων στα σιτηρέσια (Dabrowski, 1997), τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο (De Silva & Perera, 1984), η πηγή της διατροφικής πρωτεΐνης (Ferraris, 1986), η περιεκτικότητα μη αντιθρεπτικών συστατικών στο σιτηρέσιο (Nikolopoulou, 2008), ο αριθμός των γευμάτων

και το χρονικό διάστημα μεταξύ των γευμάτων (Eroldogan et al., 2004), (Deguara et al., 2003), είναι διατροφικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την πεπτικότητα των διατροφικών συστατικών των ιχθύων.

Τέλος, οι συνθήκες αποθήκευσης και η μεταφορά του σιτηρεσίου, το μέγεθος των σύμπηκτων και η παραμονή του σιτηρεσίου στο περιβάλλον εκτροφής έως τη λήψη του από τους ιχθύες επηρεάζουν την πεπτικότητα των διάφορων διατροφικών συστατικών.

1.5.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα διάφορα είδη ιχθύων έχουν διαφορετικές ικανότητες πέψης των θρεπτικών συστατικών. Αυτές οι διαφορές συνδέονται με τις διατροφικές συνήθειες του κάθε είδους (Hampel et al., 2005). Επίσης οι γενετικές διαφορές των ειδών φαίνεται να επηρεάζουν την πεπτικότητα των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων (Alarcon et al., 1998; Bassompierre et al., 1998). Στις προνύμφες ο πεπτικός σωλήνας δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως, με αποτέλεσμα οι διάφορες λειτουργίες της πέψης να είναι διαφορετικές από εκείνες των νυμφών και των ιχθυδίων (Garcia Hernandez et al., 2001). Οι χαμηλές αποδόσεις των σύμπηκτων σιτηρεσίων σε ατελή ιχθύδια του λαβρακιού οφείλονται στο ελλιπώς αναπτυγμένο πεπτικό σύστημα και στη μειωμένη ελκυστικότητα, σχετικά με εκείνες της *Artemia* (Zambonino Infante & Cahu, 1994). Το διατροφικό ιστορικό, το φύλο, το μέγεθος του ιχθύος, η σεξουαλική ωρίμανση είναι σημαντικές βιολογικές παράμετροι που επηρεάζουν την πεπτικότητα των διαφόρων διατροφικών συστατικών (Torrissen & Torrissen, 1984).

1.6. ΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ

Το εντατικό σύστημα εκτροφής τσιπούρας και λαβρακιού σε μονάδες πλωτών κλωβών βασίζεται στη συνεχή παροχή σιτηρεσίου μεγάλου κόστους, το οποίο ξεπερνά το 25 % έως 50 % (Beveridge, 2004), φθάνοντας και το 70 % του συνολικού κόστους εκτροφής (Abusdeg, 2004).

Διατροφικά, με αυξημένο συντελεστή εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου, ο συντελεστής αύξησης βάρους στο λαβράκι αυξάνεται. Η βέλτιστη χορηγούμενη ποσότητα σιτηρεσίου σε ιχθύδια βάρους 60 g είναι 3,2 % του σωματικού βάρους ημερησίως ανά δύο γεύματα (Eroldogan et al., 2004). Η βέλτιστη χορηγούμενη ποσότητα σιτηρεσίου σε νεαρά άτομα λαβρακιού βάρους 78 g είναι 1,06 % του σωματικού βάρους (Ballestrazzi et al., 1998). Αυτές οι διαφορές προκαλούνται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ηλικία και το μεγέθους του ιχθύος, η ποιότητα των υδάτων, άλλα κυρίως από διατροφικούς παράγοντες όπως η σύνθεση του σιτηρεσίου και οι διαδικασίες που ακολουθούνται κατά την παρασκευή των σιτηρεσίων.

Τα σιτηρέσια πρέπει να χαρακτηριστούν με την κάλυψη όλων των απαραίτητων αναγκών των ιχθύων στις κατάλληλες ποσότητες και είδη, ώστε η ποιότητα του σιτηρεσίου και ο

τρόπος χρησιμοποίησης του να είναι το βασικότερο κριτήριο για την αποκόμιση ικανοποιητικού κέρδους και την εκπλήρωση των διατροφικών απαιτήσεων των ιχθύων. Έτσι τα σιτηρέσια τα οποία χρησιμοποιούνται σε εντατικά συστήματα εκτροφής, χρειάζονται συνεχή βελτίωση, ανάπτυξη και γνώση των διατροφικών αναγκών οι οποίες απαιτούνται κατά την ανάπτυξη και την εφαρμογή τεχνολογίας στην παρασκευή σιτηρεσίων.

Τα σύμπηκτα σιτηρέσια τα οποία χρησιμοποιούνται σε αυτή την εκτροφή είναι περισσότερο σταθερά στο νερό, ρυπαίνουν λιγότερο, είναι βρώσιμα από τα περισσότερα εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη ιχθύων, φθηνά στη μεταφορά και εύκολα στην αποθήκευση. Και είναι μόνο κατά τι ακριβότερα αφού η προετοιμασία τους προσθέτει 20 % του κόστους παραγωγής τους (Beveridge, 2004) για τους περισσότερους μεσογειακούς ιχθύες, είναι διαθέσιμα στην αγορά, έχουν καλύτερη πεπτικότητα και η εμπορική προετοιμασία ανάλογα με την μέθοδο επεξεργασίας αυτών, μας δίνει την δυνατότητα μείωσης των αντιθρεπτικών παραγόντων.

Η παγκόσμια παραγωγή σιτηρεσίων αυξήθηκε από τα 3,6 εκατομμύρια μετρικού τόνου το 1988 στα 14 εκατομμύρια μετρικού τόνου το 2000 (Meyers, 1994), με ποσοστό αύξησης 30% ετησίως. Στην περιοχή της Μεσόγειου το 1995, οι ποσότητες σιτηρεσίου λαβρακιού και τσιπούρας που εμπορεύτηκαν ανήλθε στους 58.670 και 59.989 μετρικούς τόνους αντίστοιχα. Αυτή η ποσότητα αυξήθηκε για να φθάσει το 2000 στα 137.595 και 180.191 μετρικό τόνο αντίστοιχα (Fernandez, 2005).

Οι αυξημένες παραγόμενες ποσότητες ιχθυοκαλλιεργητικών προϊόντων, έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ζήτησης και του κόστους των σιτηρεσίων. Οι παραγόμενες ποσότητες ιχθυαλεύρου από 4.997.001 μετρικούς τόνους το 1976 ανήλθαν σε 5.944.193 μετρικούς τόνους το 1984 με ποσοστό αύξησης 18,96 % (F.A.O., 1986).

Η γνώση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, η περιεκτικότητα αυτών στα σιτηρέσια και το κόστος τους είναι απαραίτητα για την αγορά του καλύτερου σιτηρεσίου για κάθε είδος ιχθύος.

1.6.1. ΤΥΠΟΙ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ

Οι βιομηχανίες σιτηρεσίων παράγουν διαφορετικές τροφές για τη κάθε ηλικία. Η ηλικία των ιχθύων καθορίζει το μέγεθος των σύμπηκτων του σιτηρεσίου αλλά και την προέλευση των πρώτων υλών (όπως τη ζωντανή τροφή για τα ιχθύδια π.χ. ζωοπλαγκτόν). Επίσης η ηλικία (νύμφες, ιχθύδια, νεαρά και ενήλικα άτομα) είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν τις ανάγκες των μεσογειακών ιχθύων σε διάφορα διατροφικά συστατικά.

Σιτηρέσια για γεννήτορες

Η σύνθεση του σιτηρεσίου παίζει σημαντικό ρόλο στη σεξουαλική ικανότητα, στην πλευστότητα των αυγών, στο ποσοστό εκκόλαψης, στο μέσο αριθμό των αυγών ανά θηλυκό άτομο, στη σχετική γονιμότητα fecundity / kg, στο ποσοστό θνησιμότητας και παραμόρφωσης του σώματος των νυμφών (Cerdea, 1994). Αυτά τα σιτηρέσια χαρακτηρίζονται από την αυξημένη περιεκτικότητα τους σε ω-3 λιπαρά οξέα, την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες με υψηλά επίπεδα ασκορβικού οξέος και καροτινοειδή (Mylonas et al., 2003).

Σιτηρέσια νυμφικών σταδίων

Έως την 25η ημέρα της ζωής του το λαβράκι σιτίζεται αποκλειστικά με *Artemia* και τροχόζωα (Zambonino Infante & Cahu, 1994), λόγω του μη πλήρως αναπτυγμένου πεπτικού συστήματος, όπως όλα τα θαλασσινά ιχθύδια. Προτιμάται ο εμπλουτισμός τους με λιπαρά οξέα (n-3/n-6 PUFA), βιταμίνες, αμινοξέα (Navarro, 1988). Στη συνέχεια ακολουθεί απογαλακτισμός με σίτιση με μικροσύμπηκτα τα οποία περιέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης και η διάμετρος τους είναι μικρότερη των 400 μm.

Σιτηρέσια ιχθυδίων

Προορίζονται για νεαρά ιχθύδια με υψηλό ρυθμό αύξησης και περιέχουν υψηλά επίπεδα διατροφικών πρωτεϊνών. Η διάμετρος των σύμπηκτων κυμαίνεται από 1,2 mm έως 3,0 mm. (Πίνακας 1.2.). Συνήθως χρησιμοποιείται ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης ή φυτική πηγή πρωτεϊνών ως μερικός αντικαταστάτης.

Σιτηρέσια βελτιωμένα

Προορίζονται για ιχθύες ηλικίας άνω των τριών μηνών έως το τελικό βάρος. Για διάστημα που καλύπτει το 90 % της περιόδου εκτροφής, οι ιχθύς σιτίζονται με αυτά τα σιτηρέσια. Το κόστος του σιτηρεσίου και ο συντελεστής μετατρεψιμότητας του σιτηρεσίου είναι οι καθοριστικοί παράγοντες για τη σύνθεση του σιτηρεσίου. Η διάμετρος των σύμπηκτων είναι άνω των 3,0 mm. Επίσης έχει παρασκευαστεί σιτηρέσιο ώστε να καλύπτει τις διατροφικές ανάγκες της τσιπούρας και του λαβρακιού και σιτηρέσιο το οποίο χορηγείται στους τελευταίους τρεις μήνες και έχει σκοπό την αύξηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος μέσω της τροποποιημένης σύνθεσης και αλλαγής του προφίλ των λιπαρών οξέων (Boggio, 1985) και την εξάλειψη αντιβιοτικών και φαρμάκων από το σώμα των ιχθύων, καθώς δεν περιέχονται σε αυτά. Περιέχει ενισχυμένες ποσότητες καροτινοειδών. Έχει αποδειχτεί πως η περιεκτικότητα των σιτηρεσίων σε α -tocopheryl acetate μειώνει την οξειδωση των λιπαρών οξέων κατά την ψύξη (Boggio, 1985).

Σιτηρέσιο γλυκού νερού

Η αλατότητα των υδάτων εκτροφής λαβρακιού καθορίζει τις απαιτούμενες ποσότητες συμπληρωματικών διατροφικών αλάτων στα σιτηρέσια. Σε τέσσερις ομάδες λαβρακιών αρχικού βάρους 4,9 g τα οποία σιτίστηκαν με σιτηρέσια στα οποία προστέθηκε χλωριούχο νάτριο σε ποσοστά 1 %, 3 %, 5 %, 9 % σε πειραματική περίοδο 50 ημερών σε γλυκό νερό, παρατηρήθηκε πως το τελικό βάρος ήταν μεγαλύτερο κατά 19 % με καλύτερο συντελεστή αύξησης βάρους και συντελεστή εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου. Τα βέλτιστα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν στην ομάδα που σιτίστηκε με 3 % (1 % - 5 %) (Eroldogan et al., 2005). Τα λαβράκια τα οποία σιτίζονται με σιτηρέσια χωρίς συμπληρωματικά διατροφικά άλατα σε γλυκό νερό, διοχετεύουν περισσότερη ενέργεια στην οσμωρύθμισή τους (Eroldogan et al., 2004).

1.6.2. ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Σημαντικός παράγοντας που μπορεί να μεταβάλλει την πεπτικότητα είναι οι διαδικασίες προετοιμασίας των σιτηρεσίων.

Το περιεχόμενο των σιτηρεσίων είναι ένα πολυσύνθετο μείγμα από οργανικά και μη οργανικά διατροφικά συστατικά τα οποία έχουν εκτεθεί σε θερμική επεξεργασία. Ο τρόπος και η χρονική διάρκεια αυτής της επεξεργασίας διαφέρουν από το ένα εργοστάσιο στο άλλο, από μια φουρνιά σε άλλη, από τις φυτικές ύλες (από σπόρο σε σπόρο), από τις ζωικές ύλες (από είδος σε είδος) και από τις συνθήκες διατήρησης πριν την επεξεργασία ή μετά από αυτήν. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την ποιότητα του σιτηρεσίου συμπεριλαμβανομένων των πρώτων υλών. Είναι φανερό πως οι βιομηχανίες παρασκευής σιτηρεσίων χρειάζονται γρήγορες, εύκολες και φθηνές βιοχημικές εξετάσεις με ακρίβεια προβλέψεων για τη διατροφική ποιότητα των συστατικών του σιτηρεσίου.

Προετοιμασία των διατροφικών συστατικών

Η προετοιμασία των διατροφικών συστατικών γίνεται για απομόνωση και απομάκρυνση αντιθρεπτικών παραγόντων (Nikolopoulou, 2008) ή για την αύξηση του ποσοστού της διατροφικής πρωτεΐνης (Emre et al., 2008). Συχνά χρησιμοποιείται η διαδικασία της αποφλοιώσης και της εξώθησης σε φυτικές πηγές διατροφικών συστατικών, με θερμική, μηχανική και χημική επεξεργασία.

Άλλα διατροφικά συστατικά φθάνουν στις βιομηχανίες παρασκευής σιτηρεσίων σε χονδροειδείς μορφές και πρέπει να αλεσθούν ή να λειανθούν στο επιθυμητό μέγεθος με τις διάφορες διαθέσιμες μεθόδους πριν χρησιμοποιηθούν, έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια του συστατικού για να αναμιχτούν και να συμπτυχθούν άριστα. Η λείανση και η άλεση των ζωικών πρωτεϊνών είναι πιο δύσκολη από εκείνη των φυτικών πρωτεϊνών, λόγω της

περιεκτικότητάς τους σε λίπη, με αποτέλεσμα το κόστος της ενέργειας να είναι υψηλότερο (Hardy & Barrows, 2002). Σε πειραματικό επίπεδο διαφορετικές διαδικασίες λείανσης του σιτηρεσίου δεν είχαν καμία επίδραση στους συντελεστές μετατρεψιμότητας στην πέρκα *Bidyanus bidyanus*, (Booth, 2000).

Ανάμιξη των πρώτων υλών

Οι βιομηχανίες παρασκευής σιτηρεσίων στοχεύουν στην παραγωγή ενός ομοιογενούς και σταθερού μείγματος, με αποτέλεσμα τη βιομηχανική ανταγωνιστικότητα, την αύξηση των αποδόσεων των εκτρεφόμενων ιχθύων και την παροχή υψηλής ποιότητας προϊόντων στους αγοραστές (Axe, 1995). Σε αυτό το στάδιο γίνεται ανάμιξη των συστατικών για προκαθορισμένο χρόνο, με προκαθορισμένη σειρά για την παραγωγή ενός ομοιογενούς μείγματος, τα σύμπηκτα του οποίου περιέχουν την ίδια αναλογία συστατικών. Τα ιχνοστοιχεία αναμιγνύονται με μέρος ιχθυαλεύρου πριν αναμιχθούν με άλλα θρεπτικά συστατικά.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ομογένεια του μείγματος είναι το μέγεθος των σωματιδίων, το πλήθος των σωματιδίων στο μείγμα, η πυκνότητά τους, η ρευστότητά τους, η υγροσκοπικότητά τους, το ηλεκτρικό φορτίο και το σχήμα τους (Axe, 1995). Για την εξακρίβωση της ολοκλήρωσης αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιείται δείκτης κατά την ανάμιξη, όπως άλας. Οι αναμείκτες ταξινομούνται σε ανά παρτίδα αναμείκτες και συνεχείς αναμείκτες (Hardy & Barrows, 2002).

Κλιματισμός

Είναι η διαδικασία που περιλαμβάνει θερμική και μηχανική επεξεργασία του μείγματος για την προετοιμασία του για σύμψηξη. Γίνεται με ατμό σε θάλαμο ανάδευσης υπό πίεση ή ανοιχτό. Η μελέτη του Skoch (1981) για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων διαφόρων επιπέδων κλιματισμού με ατμό θερμοκρασίας 65 °C και 80 °C στην διαδικασία σύμψηξης του μείγματος απέδειξε, χρησιμοποιώντας δείκτες της ηλεκτρικής ενέργειας (watt ανά ώρα), πως ο κλιματισμός με ατμό επιτρέπει την αύξηση του ρυθμού παραγωγής και βελτιώνει την ανθεκτικότητα των σύμψηκτων κατά το χειρισμό και τη μεταφορά των τελικών σιτηρεσίων (Skoch, 1981). Γενικά αυτή η διαδικασία βοηθά τη ζελατινοποίηση του αμύλου και ενεργοποιεί μερικά διατροφικά συστατικά όπως η γλουτένη.

Σύμψηξη

Ο στόχος της σύμψηξης είναι να μετατρέψει την ομοιογενή ανάμειξη των διατροφικών συστατικών σε σταθερά σωματίδια με φυσικά χαρακτηριστικά τα οποία τα καθιστούν κατάλληλα για τη διατροφή. Υπάρχουν πολλοί τρόποι να παραχθούν τα σύμπηκτα των σιτηρεσίων μερικοί από τους οποίους είναι οι εξής:

Σύμπηκτα με συμπίεση (σύμπηξη ατμού) προκύπτουν από μια διαδικασία που αναγκάζει ένα μείγμα σιτηρεσίου, το οποίο έχει εκτεθεί σε ατμό για περίπου 5-25 δευτερόλεπτα προκειμένου να φθάσει η θερμοκρασία περίπου στους 85 °C και η υγρασία στο 16 %. Στη συνέχεια, το μείγμα ωθείται μέσα από οπές που βρίσκονται σε ένα μεταλλικό κύβο και κόβεται κατά την έξοδο στο επιθυμητό μεγέθος με μεταλλικό κόφτη. Η πυκνότητα των σύμπηκτων κυμαίνεται 0,5–0,6 g / cm³ (Hardy & Barrows, 2002).

Σύμπηκτα ξηρής εξώθησης προκύπτουν γενικά με την ίδια διαδικασία η οποία όμως είναι μεν ακριβότερη αλλά πιο εύκολη στον έλεγχο της πυκνότητας των σύμπηκτων για την επιθυμητή πλευστότητα και την προσθήκη υψηλών σχετικά επιπέδων λιπών. Επιτυγχάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του μείγματος σε 125 – 150 °C υπό πίεση θαλάμου και την αύξηση της υγρασίας σε 20 – 24 % με αποτέλεσμα την ζελατινοποίηση του αμύλου. Μέσα σε μια μεταλλική χοάνη συσσωρεύεται το μείγμα με μορφή ζύμης. Υπό την πίεση του βάρους το μείγμα οδηγείται προς τον μεταλλικό κύβο όπου μετατρέπεται ο ατμός σε υγρή μορφή. Κατά την έξοδο των σύμπηκτων από τον κύβο, η μείωση της πίεσης προκαλεί παγίδευση αέρος στα σύμπηκτα, η οποία ελέγχεται κατάλληλα για να εξασφαλιστεί γρήγορη ή αργή καταβύθιση. Η πυκνότητα των σύμπηκτων είναι 0,25 – 0,3 g / cm³ (Hardy & Barrows, 2002).

Στα σύμπηκτα μαγειρικής (universal pellet cooker), χρειάζεται το μείγμα κλιματισμό με ατμό για 2-3 λεπτά, ο οποίος ζελατινοποιεί το άμυλο κατά 50 % και αυξάνει την υγρασία κατά 16-18 %. Η ζελατινοποίηση του 60 – 80 % αμύλου επιτυγχάνεται με έναν ταχύ στροφέο στον μεταλλικό κύβο (Hardy & Barrows, 2002).

Τα τελευταία βήματα της διαδικασίας παραγωγής σιτηρεσίων είναι ο θρυμματισμός με τροχιστή, αφού κρυνώσουν τα σύμπηκτα για την αποφυγή της περαιτέρω διάλυσης των σύμπηκτων κατά τη χρήση και τη μεταφορά.

Η ανάγκη για την πραγματοποίηση ποιοτικού ελέγχου των σιτηρεσίων, καθορίζεται βασικά από τη συνεχή ανάγκη για την εύρεση και κατασκευή σιτηρεσίων με θρεπτικά υλικά τα οποία θα καλύψουν τις διατροφικές ανάγκες των εκτρεφόμενων ιχθύων με χαμηλότερο κόστος, αλλά και με μείωση του χρονικού διαστήματος για την επίτευξη του εμπορεύσιμου μεγέθους. Έτσι γίνεται γενικός ποιοτικός έλεγχος ο οποίος συμπεριλαμβάνει τον έλεγχο του μεγέθους των σύμπηκτων, την επιστροφή της σκόνης από την διαδικασία του θρυμματισμού για επανασύμπηξη, το έλεγχο της ανάμιξης και την πυκνότητα των σύμπηκτων.

Η επικάλυψη των σύμπηκτων με ευαίσθητα διατροφικά συστατικά όπως λίπη, ένζυμα, χρωστικές ύλες και βιταμίνες, τα οποία προσθέτονται με ψεκασμό είναι το τελευταίο βήμα της διαδικασίας παρασκευής σιτηρεσίων.

1.7. ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ

Τα κριτήρια για την επιλογή των διατροφικών συστατικών είναι τα εξής (Glencross et al., 2007):

- Τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης (χημική σύσταση, μεταβλητότητα της σύνθεσης του και η πηγή προέλευσης)
- Η πεπτικότητα τους από το εκτρεφόμενο είδος
- Η γευστικότητα τους από το εκτρεφόμενο είδος
- Η αξιοποίηση τους από το εκτρεφόμενο είδος
- Η επεξεργασία τους στα διάφορα στάδια παρασκευής του σιτηρεσίου

Υψηλή ποιότητα σιτηρεσίων δεν μπορεί να παραχθεί από φτωχές σε ποιότητα πρώτες ύλες. Διάφορες πρώτες ύλες έχουν χρησιμοποιηθεί στη διατροφή των ιχθύων. Από αυτές είναι και οι ακόλουθες:

Ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο

Το ιχθυάλευρο θεωρείται σημαντική και πλούσια πηγή πρωτεϊνών στα σιτηρέσια για τους ιχθύες, είτε είναι σαρκοφάγοι ή παμφάγοι. Σε μερικά σιτηρέσια χρησιμοποιείται με ποσοστό 50 % (Glencross et al., 2007).

Η ποιότητα του ιχθυάλευρου, η παραλαβή του από τις χώρες προέλευσης και η τιμή του, αντιπροσωπεύουν τις δυσκολίες στην χρήση του στα σιτηρέσια (Glencross et al., 2007). Η τιμή του ιχθυάλευρου καθορίζει κατά μεγάλο ποσοστό την τιμή των σιτηρεσίων και σχετίζεται με την τιμή της σόγιας η οποία χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου (Fishmeal Market Report, 2009).

Το 2004 η ετήσια παραγωγή ιχθυάλευρου ανήλθε σε 7,05 εκατομμύρια τόνους. Τα επόμενα χρόνια εξαιτίας του φαινομένου El Niño, μειώθηκε η παραγωγή κατά 5.000.000 μετρικούς τόνους εξαιτίας της αύξησης της θερμοκρασίας των ωκεανών. Το 2008 η παραγωγή ιχθυάλευρου ήταν γύρω στους 2.608.000 μετρικούς τόνους. Η τιμή του έφτασε τα 700 \$ ανά μετρικό τόνο το 2006 και τα 1000 \$ ανά μετρικό τόνο το 2008 (Tacon, 2004; Fishmeal Market Report, 2009). Το Περού αντιπροσωπεύει το 25 % της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυάλευρου. Η έντονη ζήτηση ιχθυάλευρου ειδικά από χώρες της ανατολικής Ασίας, όπως η Κίνα, η οποία απορρόφησε πάνω από 1.000.000 τόνους για την κάλυψη των αναγκών της, βοηθάει στην ανοδική πορεία των τιμών του (Hardy, 2006). Στις ιχθυοκαλλιέργειες η χρησιμοποίησή του το 2002 ήταν 2.217.000 μετρικοί τόνοι (Hardy, 2006). Μπορεί να αντικατασταθεί με φυτικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες μονοκύτταρων οργανισμών οι οποίες οικονομικά και διατροφικά έχουν διαφορετική απόδοση.

Σόγια

Χρησιμοποιήθηκε ως πηγή πρωτεΐνης το σογιάλευρο και το σογιέλαιο, τα οποία είναι από τις πιο πλέον καθιερωμένες εναλλακτικές λύσεις για το ιχθυάλευρο. Περιέχει αντιθρεπτικά

συστατικά τα οποία μειώνουν τη διατροφική αξία και δημιουργεί προβλήματα στην πέψη (Glencross et al., 2007). Η περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνη είναι 518 g / kg. Μετά από προεπεξεργασία με τη διαδικασία της εξώθησης, σε τσιπούρες βάρους 9 g και 50 g, οι δείκτες της πεπτικότητας ήταν πλησιέστεροι έως καλύτεροι από αυτόν του ιχθυάλευρου (Venou et al., 2006).

Κράμβη

Χρησιμοποιήθηκε ως πηγή πρωτεΐνης το κραμβάλευρο και το κραμβέλαιο. Η περιεκτικότητα του κραμβάλευρου σε πρωτεΐνες κυμαίνεται από 32 – 45 % του ξηρού βάρους. Έχει χρησιμοποιηθεί σε τσιπούρα και σε γιαπωνέζικο λαβράκι (*Lateolabrax Japonicus*). Σε μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου σε ποσοστό 10 %, 20 %, 30 %, 40% και 50% οι δείκτες της πεπτικότητας της πρωτεΐνης ήταν 87,5 %, 84,1 %, 77,9 %, 81,1 % και 80,0 % αντίστοιχα σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο το οποίο είχε 89,1 %. Ο συντελεστής αύξησης βάρους ήταν 3,46 %, 3,35 %, 3,15 %, 3,02 % και 2,52 % σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο το οποίο είχε 3,52 %, στο γιαπωνέζικο λαβράκι βάρους 8,3g σε ιχθυοκλωβούς (Cheng, 2010).

Λούπινο

Χρησιμοποιήθηκε το λουπινάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης στα σιτηρέσια, μετά από προεπεξεργασία με την διαδικασία της εξώθησης. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη κυμαίνεται από 47,1 % έως 43,4 % και σε λίπος από 10,6 % έως 10 %. Ως μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου με ποσοστό 30 % και 70 % σε πείραμα ιχθυδίων πέστροφας βάρους 23g, οι δείκτες της πεπτικότητας της πρωτεΐνης ήταν 92,5 % και 94,5 % αντίστοιχα και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με το ιχθυάλευρο το οποίο είχε 88,9 %. Η ημερήσια αύξηση βάρους ήταν 3,1 % και 1,5 % αντίστοιχα σε σχέση με το ιχθυάλευρο το οποίο είχε 2,7 % (Burel et al., 1998).

Χαρούπι

Χρησιμοποιήθηκε το φύτρο του σπέρματος του χαρουπιού ως πηγή πρωτεΐνης στα σιτηρέσια. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη είναι 35,84%, σε ολικούς μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες είναι 32,34% και σε λίπος 3,68%. Χρειάζεται προεπεξεργασία πριν τη χρήση του καθώς περιέχει ταννίνες. Ως μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου σε πείραμα λαβρακιών βάρους 90 g, οι δείκτες της πεπτικότητας της πρωτεΐνης ήταν 91,60 % και σε τσιπούρες 88,87 %. Με χρήση αποκλειστικά ιχθυάλευρου οι δείκτες της πεπτικότητας ήταν 95,87 % και 90,55 % αντίστοιχα σε θερμοκρασία 25 °C (Nikolopoulou, 2008).

Μπιζέλι

Χρησιμοποιήθηκε ως πηγή πρωτεΐνης στα σιτηρέσια. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη κυμαίνεται από 24,3 % έως 32,6 %, σε άμυλο από 33,4 % έως 47,5% και σε λίπος από

0,8% έως 4 %. Προεπεξεργάζεται με τη διαδικασία της εξώθησης, καθώς περιέχει αντιθρεπτικά συστατικά (ταννίνες). Ως μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου, οι δείκτες της πεπτικότητας της πρωτεΐνης μετά από την προαναφερόμενη επεξεργασία σε πείραμα λαυρακιών βάρους 200 g ήταν 88,3 %, σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο, στο οποίο ήταν 95,1%, σε θερμοκρασία 27 °C (Nikolopoulou, 2008).

Ρεβύθι

Χρησιμοποιήθηκε ως πηγή πρωτεΐνης στα σιτηρέσια. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη κυμαίνεται από 19 % έως 23 %, σε άμυλο από 39,5 % έως 46,6 % και σε λίπος από 4 % έως 7 %. Προεπεξεργάζεται, καθώς περιέχει αντιθρεπτικά συστατικά (ταννίνες), μηχανικά με τη διαδικασία της αποφλοΐωσης και θερμικά με τη διαδικασία της εξώθησης. Ως μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου, οι δείκτες της πεπτικότητας της πρωτεΐνης μετά από την προαναφερόμενη επεξεργασία σε πείραμα λαυρακιών βάρους 200 g ήταν 90,5 % σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο στο οποίο ήταν 95,1 %, σε θερμοκρασία 27 °C (Nikolopoulou, 2008).

Φουντούκι

Χρησιμοποιήθηκε ως φουντουκάλευρο (*hazelnut meal*) σε σιτηρέσιο λαβρακιού. Θεωρείται πλούσια πηγή πρωτεϊνών με ποσοστό 40 % μετά από ειδική επεξεργασία για την απομόνωση και απομάκρυνση των λιπών. Σε μερική και ολική αντικατάσταση με το ιχθυάλευρο (0 %, 7,5 %, 15 %, 22,5 % και 30 %) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές στη σύνθεση του σώματος στο τελικό βάρος, σε λαβράκια βάρους 19,16 g μετά από 10 εβδομάδες πειραματικής περιόδου (Emre et al., 2008).

Επίσης χρησιμοποιούνται ως διατροφικά συστατικά στα σιτηρέσια το σιτάλευρο, από τις ζωικές πηγές το κρεατάλευρο και το αιματάλευρο (Glencross et al., 2007).

ΕΞΩΓΕΝΗ ENZYMA ΩΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗ ΥΛΗ ΣΤΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ

Η ύπαρξη των εξωγενών ενζύμων στα σιτηρέσια τα οποία είναι μη διατροφικά στοιχεία, έχει ως στόχο τη βελτιστοποίηση της εκμετάλλευσης των διαφόρων διατροφικών στοιχείων τα οποία περιέχονται στα σιτηρέσια, κατά την πέψη και την απορρόφηση (Kolkovski et al., 1993). Τα προστιθέμενα υλικά έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (ιχθύες) και να διατηρούν την καλή φυσιολογική κατάσταση των ιχθύων. Χρησιμοποιούνται και για τη σταθερότητα των διαφόρων σιτηρεσίων κατά τη βιομηχανική αποθήκευσή τους ή για λόγους υγιεινής (Neeser, 2004).

Τα εξωγενή ένζυμα παίζουν αυξητικό ρόλο στη διατροφική αξία των διαφόρων σιτηρεσίων με την αύξηση της αποδοτικότητάς τους ή την αύξηση του τελικού βάρους των παραγόμενων ιχθύων (Kolkovski, 2001). Τα περισσότερα από αυτά χάνουν την δραστηριότητά τους σε θερμοκρασία άνω των 65 °C, για αυτό η προσθήκη τους γίνεται με

ψεκασμό των σύμπηκτων μετά τη θερμική και τη μηχανική επεξεργασία τους (Hardy & Barrows, 2002).

Η απορρόφηση των αμινοξέων αυξάνεται με την αυξημένη δραστικότητα πρωτεασών. Για τις πρωτεάσες υπάρχουν τρεις πηγές από τις οποίες αντλούνται ως ενζυμικά πρόσθετα για τον άνθρωπο και τα διάφορα ζώα συμπεριλαμβανομένων των ιχθύων. Αυτές είναι οι εξής: Ζωική πηγή όπως η καταλάση από συκώτι βοοειδών, πεψίνη, ρενίνη, θρυψίνη. Γενικά όμως τα ζώα είναι φτωχή πηγή ενζύμων λόγω του αργού ρυθμού ανάπτυξης τους. Επιπλέον η τιμή τους στην αγορά και η δύσκολη εξαγωγή τους από τους ζωικούς ιστούς την καθιστούν ασύμφορη πηγή ενζύμων.

Φυτική πηγή για εξωγενή ένζυμα όπως η βρωμελαΐνη και η παπαΐνη και διάφορες βύνες, χαρακτηρίζονται από ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τη ζωική πηγή ενζύμων. Μπορεί να παραχθεί μια σταθερή ποσότητα ενζύμων ετησίως, αλλά για βιομηχανική χρήση γίνεται παραγωγή μόνο αυτών τα οποία έχουν θεραπευτικές ιδιότητες λόγω του μακρού χρόνου ο οποίος απαιτείται για την παραγωγή τους.

Μικροβιακοί ή ενδοκυτταρικοί οργανισμοί, ως πηγή εξωγενών ενζύμων, θεωρούνται η καλύτερη πηγή ενζύμων για τη χρήση τους ως προστιθέμενα υλικά στα σιτηρέσια. Τα πιο συνηθισμένα μικρόβια για την παραγωγή πρωτεασών στη βιομηχανία τροφίμων είναι τα *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoproteolyticus*, *Rhizopus niveus* (Neeser, 2004). Αυτά τα μικρόβια τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγή ενζύμων θεωρούνται εύκολα στην εξαγωγή των ενζύμων καθώς χαρακτηρίζονται από ταχύ ρυθμό ανάπτυξης και τα ένζυμα που παράγουν εκκρίνονται εξωκυτταρικά. Συνιστάται η μη χρήση παθογενετικών οργανισμών και η καλλιέργεια, εξαγωγή και καθαρισμός να γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες (Neeser, 2004).

Σε γενικές γραμμές τα ένζυμα από μικρόβια παράγονται με την εξής διαδικασία: Διατήρηση των πρωτότυπων, καλλιέργεια μετά από εμβολιασμό, μέτρηση του όγκου της καλλιέργειας, συγκομιδή των μικροοργανισμών, απομάκρυνση των κυττάρων και τέλος χρωματογραφικός καθαρισμός των ενζύμων (Neeser, 2004).

1.8. ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Στις μονάδες εκτροφής τσιπούρας και λαβρακιού η μείωση του κόστους των σιτηρεσίων, χωρίς την ύπαρξη ταυτόχρονης μείωσης της παραγόμενης ποσότητας ιχθύων, είναι απαραίτητο να συνοδεύεται από ένα αξιόπιστο δείκτη για την αξιολόγηση και τη σύγκριση ποικίλων σιτηρεσίων και συστατικών τα οποία περιέχονται σε αυτά.

Η πεπτικότητα και η ενεργειακή αξία των διατροφικών συστατικών στα σιτηρέσια είναι κριτήρια βάση των οποίων παρασκευάζονται τα σύγχρονα σιτηρέσια (Cho & Kaushik, 1990) και είναι απαραίτητα για την εκτίμηση της διατροφικής αξίας τους (Glencross et al., 2007). Επίσης η γνώση της πεπτικότητας των σιτηρεσίων, της περιεκτικότητας τους σε

θρεπτικά συστατικά, της απορρόφησης των θρεπτικών και η τιμή τους στην αγορά είναι οι καθοριστικοί παράγοντες για την αγορά κατάλληλου σιτηρεσίου. Συνοψίζοντας τα προαναφερθέντα είμαστε σε θέση να κατανοήσουμε τη σημαντικότητα των βαθμών της πεπτικότητας των διαφόρων θρεπτικών συστατικών στην αξιολόγηση των σιτηρεσίων και την καθιέρωση αξιόπιστων δεικτών στις βιομηχανίες παρασκευής σιτηρεσίων για την επιλογή των διατροφικών συστατικών τα οποία ανταποκρίνονται στις βιολογικές, οικονομικές και περιβαλλοντολογικές απαιτήσεις.

Το εκατοστιαίο ποσοστό του συντελεστή πεπτικότητας προκύπτει από το γινόμενο της διαφοράς μεταξύ της ποσότητας της προσλαμβανόμενης διατροφικής ουσίας των σιτηρεσίων μείον την ποσότητα της διατροφικής ουσίας των περιττωμάτων επί εκατό. Ο αριθμός ο οποίος προκύπτει διαιρείται με την ποσότητα της διατροφικής ουσίας των σιτηρεσίων.

Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από αυτόν τον υπολογισμό αντιπροσωπεύουν το φαινομενικό συντελεστή πεπτικότητας ενός διατροφικού συστατικού.

Ο συντελεστής πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης είναι το ποσοστό της πρωτεΐνης, η οποία πέπτεται και απορροφάται από τον οργανισμό και δεν εκκρίνεται στα περιττώματα.

Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας ορίζεται ως η ποσότητα του καταναλωμένου σιτηρεσίου σε kg, η οποία χρησίμευσε για να παραχθεί 1kg ιχθύος (νωπού βάρους).

1.8.1. *In vivo* μέθοδοι προσδιορισμού της πεπτικότητας

Για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας *in vivo* υπάρχουν δύο βασικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις, οι οποίες αποτελούνται από τις άμεσες και έμμεσες μεθόδους αξιολόγησης.

Οι έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού της πεπτικότητας μας δίνουν το φαινομενικό συντελεστή πεπτικότητας (Glencross et al., 2007) ο οποίος υπολογίζεται με την αντιστοίχιση των αναλύσεων των θρεπτικών ουσιών οι οποίες περιέχονται στα σιτηρέσια με αυτές των περιττωμάτων. Η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών είναι η συνολική ποσότητα των θρεπτικών συστατικών τα οποία έχουν απορροφηθεί από το έντερο. Η αντιστοίχιση απαιτεί αντιπροσωπευτικό δείγμα από το χορηγούμενο σιτηρέσιο και από τα περιττώματα και δείκτη ο οποίος προστίθεται κατά την παρασκευή του σιτηρεσίου και δεν πέπτεται (Glencross et al., 2007). Αύτη η τιμή ονομάζεται φαινομενικός συντελεστής πεπτικότητας, λόγω της ύπαρξης ενδογενούς προέλευσης υλικών, όπως πεπτικών ενζύμων, αλάτων της χολής, εντερικών υγρών, βακτηρίων της χλωρίδας και επιφανειακών κυττάρων του εντερικού δέρματος.

Ως δείκτες χρησιμοποιούνται το οξείδιο του χρωμίου (Cr_2O_3) (Nikolopoulou, 2008), το οποίο χρησιμοποιείται συχνά στα διατροφικά πειράματα υδατοκαλλιεργειών (Glencross et al., 2007) και το οξείδιο του υττερβίου. Επίσης χρησιμοποιούνται και ενδογενείς δείκτες όπως οι ακατέργαστες ίνες και όξυ-αδιάλυτη τέφρα.

Ο υπολογισμός γίνεται με την εξής εξίσωση:

$$(\%) \Sigma.\Delta.\Pi. \Theta_P = 100 - [\{ (\% \text{ δείκτη σιτηρέσιο} - \% \text{ δείκτη περιττώματα}) * (\% \Theta \Sigma \text{ περιττωμάτων}) \div (\% \Theta \Sigma \text{ σιτηρέσιο}) \} * 100]$$

Όπου, $\Theta \Sigma$: θρεπτικό συστατικό και $(\%) \Sigma.\Delta.\Pi. \Theta_P$: σχετικός δείκτης πεπτικότητας για κάθε θρεπτικό συστατικό (πρωτεΐνη, λίπος, άμυλο) (Nikolopoulou, 2008).

$$(\%) \Sigma.\Delta.\Pi. \Theta_P = [\Delta.\Pi. \Theta_P \text{ Π.Ι.} - \{ \Delta.\Pi. \Theta_P \text{ ΠΡ.Ι} * 70\% \}] / 30\%$$

Όπου $\Delta.\Pi. \Theta_P \text{ Π.Ι.}$: δείκτης πεπτικότητας στο πειραματικό σιτηρέσιο και

$\Delta.\Pi. \Theta_P \text{ ΠΡ.Ι.}$: δείκτης πεπτικότητας στο πρότυπο σιτηρέσιο (Cho & Slinger, 1979).

Η αντιστοίχιση στις άμεσες μεθόδους αξιολόγησης της πεπτικότητας απαιτούν όλη την ποσότητα του χορηγούμενου σιτηρεσίου και τη συλλογή όλης της ποσότητας των περιττωμάτων.

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι συλλογής των περιττωμάτων: ανατομική, εκχύλιση και συλλογή των αποβαλλόμενων περιττωμάτων. Κατά τη συλλογή των περιττωμάτων με ανατομία και απογύμνωση υπάρχει πιθανότητα υποεκτίμησης της πεπτικότητας, λόγω της ατελούς πέψης και της πιθανότητας μόλυνσης του συλλεγόμενου δείγματος με ενδογενές υλικό. Δύσκολα εφαρμόζεται σε ατελή ιχθύδια. Όταν συλλέγονται τα περιττώματα από το νερό με χρήση παγίδων υπάρχει δυνατότητα υπερεκτίμησης της πεπτικότητας, λόγω της έκπλυσης των θρεπτικών συστατικών (Glencross et al., 2007). Η χρήση κυλινδροκωνικών δεξαμενών θεωρείται απλή και προτείνεται με ειδικές εφαρμογές στο κάτω μέρος της δεξαμενής για τη συλλογή των περιττωμάτων (Cho & Slinger, 1979; Nikolopoulou, 2008). Ο εγκλιματισμός των ιχθύων για χρονική περίοδο 7 ημερών με τα υπό εξέταση πειραματικά σιτηρέσια εφαρμόζεται από τους περισσότερους ερευνητές (Glencross et al., 2007), (Nikolopoulou, 2008). Ο υπολογισμός της πεπτικότητας στις υδατοκαλλιέργειες έγινε για πρώτη φορά από τους (Cho & Slinger, 1979).

1.8.2. *In vitro* μέθοδοι προσδιορισμού της πεπτικότητας

Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και περισσότερο χρήση διαφόρων *in vitro* μεθόδων προσδιορισμού της πεπτικότητας, οι οποίες είναι εναλλακτικές για τους *in vivo* προσδιορισμούς της πεπτικότητας της πρωτεΐνης και άλλων διατροφικών συστατικών, βάση της ενζυμικής υδρόλυσης ως προσομοίωσης της διαδικασίας της πέψης στους ιχθύες. Οι εφαρμογές ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν, από τον άνθρωπο πρακτικά, αιώνες πριν για την τροποποίηση των λειτουργιών και την αλλαγή των θρεπτικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών των τροφίμων με αποτέλεσμα την παραγωγή παραδοσιακών τροφίμων (Spellman et al., 2003). Γενικά η ενζυμική πρωτεόλυση έχει αποδεχτεί πως αυξάνει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών, τροποποιεί τις ιδιότητες ζελατινοποίησης και γαλακτοποίησης

των πρωτεϊνών και ελευθερώνει βιοενεργά πεπτίδια (Spellman et al., 2003). Οι *in vitro* μέθοδοι προσδιορισμού της πεπτικότητας στην πλειοψηφία τους χρησιμοποιούν εμπορικά ένζυμα. Η λήψη πεπτικών ενζύμων από τμήματα του πεπτικού συστήματος του λαβρακιού γίνεται μετά από ειδική επεξεργασία. Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι εξής μέθοδοι:

- Η Lazo single- enzyme μέθοδος (Lazo, 1998)

Χρησιμοποιεί θρυψίνη και βασίζεται στην αύξηση του επιπέδου pH κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Σχετική πεπτικότητα της πρωτεΐνης (RPD) = $[(-\Delta\text{pH}_{\text{στατικό}}) - (-\Delta\text{pH}_{\text{casein}})] \times 100$

Χρησιμοποιήθηκε σε

Γαρίδα *Penaeus vannamei* (Lazo, 1998)

Ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972), (Fenerci, 2005).

Symphysodon aequifasciata (Chong et al., 2002).

- Χρήση ακινητοποιημένων πεπτικών ενζύμων (IDEA)

Η πεπτικότητα $D = \frac{A_{340}^f - A_{340}^o}{A_{340}^{\text{Acid}} - A_{340}^{\text{amide}}}$

Υπολογίζει τους πεπτιδικούς δεσμούς οι οποίοι υδρολύθηκαν βασιζόμενη στον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινομάδων με την αντίδραση O-phthalaldehyde.

Χρησιμοποιούνται δύο βιοαντιδραστήρες: ο πρώτος για όξινη πέψη με την παψίνη και ο δεύτερος για την αλκαλική πέψη με τη θρυψίνη, τη χυμοθρυψίνη και άλλες πεπτιδάσες.

Χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες τροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης (Thresher et al., 1989).

- Η μέθοδος pH-stat η οποία θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στους ιχθύες το 1994 από τους Dimes και Haard (1994) για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης στο σολομό. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αυθόρμητη πρόσληψη πρωτονίων από τις ελεύθερες αμινομάδες που προκύπτουν από την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Όταν η υδρόλυση των δεσμών πραγματοποιείται σε αλκαλικό pH αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του pH της αντίδρασης. Ο αριθμός των διασπώμενων πεπτιδικών δεσμών υπολογίζεται από το ποσό της βάσης που απαιτείται για τη διατήρηση του pH του μείγματος σε σταθερό επίπεδο κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Spellman et al., 2003).

Ο βαθμός της ενζυμικής υδρόλυσης (DH) ορίζεται ως το ποσοστό του συνολικού αριθμού των πεπτιδικών δεσμών σε μία πρωτεΐνη (Adler-Nissen, 1986). Αυτός υπολογίστηκε με τρεις μεθόδους, TNBS, OPA και pH stat. Διαφορές στο βαθμό (DH) αυτών των τριών μεθόδων έχουν παρατηρηθεί, με αποτέλεσμα η αξιοπιστία της κάθε μεθόδου να διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του χρησιμοποιημένου ενζύμου και το είδος της πρωτεΐνης (Spellman et al., 2003).

Επιπλέον χρησιμοποιούνται μινκ, η μέθοδος Hsu multi-enzyme και η μέθοδος Saterlee multi-enzyme για την αξιολόγηση της πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών (Chong et al., 2002).

1.8.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κάθε μεθόδου

Στις *in vivo* μεθόδους υπολογισμού της πεπτικότητας, οι συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων για το φαινομενικό συντελεστή πεπτικότητας πρέπει να ερμηνευτούν προσεκτικά, επειδή τα διαφορετικά αποτελέσματα τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία σχετικά με αυτό το θέμα αποκλίνουν και αυτή η απόκλιση θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορετικές συνθέσεις των πειραματικών σιτηρεσίων και κυρίως στην περιεκτικότητα των πειραματικών σιτηρεσίων σε μη πεπτόμενα στοιχεία ή στοιχεία με χαμηλή πεπτικότητα όπως το άμυλο (Nikolopoulou, 2008). Επίσης μπορεί να οφείλονται στο ποσό των αντιδιατροφικών στοιχείων, στις τεχνολογικές μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται για επεξεργασία των συστατικών του σιτηρεσίου ή στη μέθοδο συλλογής περιττωμάτων.

Μια άλλη παράμετρος η οποία μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές μεταξύ των μελετών είναι τα πειραματικά μεθοδολογικά σφάλματα καθώς οι μετρήσεις πεπτικότητας είναι ανακριβείς και αναξιόπιστες στα *in vivo* πειράματα. Πειραματικά σφάλματα θα μπορούσαν να προκληθούν στο τρόπο πρόσληψης του σιτηρεσίου και αποβολής περιττωμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες του νερού. Έχει αποδειχτεί, ότι η μείωση του φαινομενικού συντελεστή πεπτικότητας εξαιτίας της μείωσης της θερμοκρασίας, οφείλεται στη μείωση της πρόσληψης του σιτηρεσίου η οποία επηρεάζεται σημαντικά με την αλλαγή της θερμοκρασίας (Kaushik, 1980). Ένα συνεχές χαρακτηριστικό είναι η μείωση του ρυθμού μετακίνησης του σιτηρεσίου κατά μήκος της πεπτικής οδού, εξαιτίας της μείωσης της θερμοκρασίας. Από την άλλη πλευρά όμως, η παραμονή του σιτηρεσίου στο πεπτικό σύστημα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποζημιώνει τη μικρή αποδοτικότητα πέψης σε μικρές θερμοκρασίες (Fauconneau et al., 1983).

Η μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων σε χαμηλή θερμοκρασία νερού, η ενδογενής απώλεια στο έντερο ανά γραμμάριο πειραματικού σιτηρεσίου, θα μπορούσαν να προκαλέσουν τη μείωση του φαινομενικού συντελεστή πεπτικότητας με τη μείωση της θερμοκρασίας. Σε περίπτωση χαμηλής πρόσληψης του σιτηρεσίου οι ενδογενείς απώλειες του εντέρου μπορεί να αντιπροσωπεύσουν μεγάλο ποσοστό των αποβλήτων. Αυτή η επίδραση θα οδηγούσε στη μείωση του φαινομενικού συντελεστή πεπτικότητας (Azevedo et al., 1998).

Τα ενδογενούς προέλευσης υλικά, σε *in vivo* πειράματα μέτρησης της πεπτικότητας, υπολογίζονται με τη χρήση δοκιμαστικού σιτηρεσίου γνωστής πεπτικότητας ή με τη χρήση διαφόρων διατροφικών επιπέδων έως και τον υπολογισμό του επίπεδου μηδέν. Αυτή η

διαφορά μεταξύ του φαινομενικού και του πραγματικού συντελεστή πεπτικότητας είναι πολύ μικρή στις πρωτεΐνες, στα λίπη και στους υδατάνθρακες σε σύγκριση με άλλα ιχνοστοιχεία (Sugiura, 2000).

Στις *in vitro* μεθόδους οι υπολογισμοί της πεπτικότητας εργαστηριακά, στο σύνολο τους θεωρούνται πρακτικές μέθοδοι, για την εκτίμηση της ποιότητας των σιτηρεσίων ή την εκτίμηση της διαδικασίας της πέψης στους ιχθύες (Dimes & Haard, 1994).

Η αυξημένη κατανόηση της υγείας των ιχθύων και της εξασφάλισης της ευημερίας τους καθώς και η ύπαρξη ηθικού διλλήματος ως προς τον τρόπο αντιμετώπισης των ιχθύων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν τα κίνητρα για την εξέλιξη των μεθόδων *in vitro* (Tacon, 1995; Alarcon et al., 2002). Η διαδικασία αξιολόγησης και μέτρησης μεγάλου αριθμού θρεπτικών συστατικών τα οποία χρησιμοποιούνται ή ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν στα σιτηρέσια, επωφελείται από τις πρόσφατες εξελίξεις στις διάφορες μεθόδους πεπτικότητας *in vitro* για τα σιτηρέσια (Alarcon et al., 2002). Η μέθοδος *in vitro* έχει το πλεονέκτημα των γρήγορων αποτελεσμάτων, εύκολη στη χρήση και με ικανοποιητικό κόστος (Rozan et al., 1997), (Alarcon et al., 2002). Η *in vitro* μέθοδος μέτρησης της πεπτικότητας καθιστά δυνατή τη λεπτομερή μελέτη των διαφόρων προϊόντων κατά την διάρκεια της πέψης, η οποία εκτελείται υπό διάφορες συνθήκες εγκλιματισμού (Messman & Weiss, 1994).

Η μέθοδος pH-stat είναι οικονομική, αφού βασίζεται σε οικονομικό εξοπλισμό και φθηνά αναλώσιμα και διαλύματα για τη χρήση και τη μέτρηση της πεπτικότητας όπως επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλες εμπορικές πηγές ενζύμων ποικίλης ζωικής προέλευσης όταν δεν είναι διαθέσιμα ένζυμα ιχθύων ή η μεταφορά τους είναι ασύμφορη οικονομικά (απασχόληση επιπλέον προσωπικού, υψηλή τιμή καυσίμων και ξηρού πάγου, διαθεσιμότητα των κατάλληλων ιχθύων) (Alarcon et al., 2002). Σε αντίθεση η *in vivo* μέθοδος απαιτεί εκτρεφόμενους ιχθύες υπό ελεγχόμενες συνθήκες εκτροφής πράγμα το οποίο προϋποθέτει διαθεσιμότητα δεξαμενών εκτροφής, συστήματα παροχής νερού, σύστημα σύλληψης περιττωμάτων, αντλίες, έλεγχο περιβαλλοντικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα, το pH και ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού.

Για όλους τους παραπάνω λόγους στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής προτάσσεται η περαιτέρω αξιολόγηση της μεθόδου pH-stat, προκειμένου να τροποποιηθεί και να βελτιστοποιηθεί και να συμπεριλάβει τις περιβαλλοντικές και βιολογικές παραμέτρους που επηρεάζουν την πεπτικότητα των μεσογειακών ειδών ιχθύων (Aufreere et al., 1988).

1.9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

- Ανάπτυξη και βελτίωση της μεθόδου pH-stat για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης στο λαβράκι με προσομοίωση διάφορων περιβαλλοντικών και βιολογικών παραμέτρων όπως αλατότητα, θερμοκρασία, pH, προηγούμενη όξινη πέψη,

ενζυμικό προφίλ και συγκέντρωση του υποστρώματος χρησιμοποιώντας αναπτυσσόμενη μη γραμμική συσχέτιση.

- Μελέτη της επίδρασης των παραπάνω περιβαλλοντικών και βιολογικών παραμέτρων στο βαθμό της αυτοϋδρόλυσης και της ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιώντας τη στατιστική και το διαφορικό λογισμό, υπό μορφή αναπτυσσόμενων εξισώσεων.
- Εφαρμογή της μεθόδου για την αξιολόγηση πειραματικών σιτηρεσίων με διάφορες μεθόδους επεξεργασίας οσπρίων ως πηγή πρωτεϊνών και σύγκριση των αποτελεσμάτων πεπτικότητας *in vitro* με διαθέσιμους δείκτες πεπτικότητας *in vivo*.
- Εφαρμογή της μεθόδου σε πειραματικά σιτηρέσια εμπλουτισμένα με ανασυνδυασμένα ένζυμα και σύγκριση των αποτελεσμάτων πεπτικότητας με βιολογικές παραμέτρους, όπως συντελεστή αύξησης του βάρους και συντελεστή εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου σε τσιπούρες οι οποίες σιτίστηκαν με το συγκεκριμένο σιτηρέσιο.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *IN VITRO*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *IN VITRO*

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο προσδιορισμός της πεπτικότητας ενός σιτηρεσίου σε διαφορετικές περιβαλλοντολογικές συνθήκες και υπό διαφορετικά φυσιολογικά καθεστάτα, είναι το πρώτο βήμα για την αξιολόγηση του βαθμού βιοδιαθεσιμότητάς του για κάθε ζωντανό οργανισμό.

Για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών ενός σιτηρεσίου έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι *in vivo* και *in vitro*. Αν και οι μεθοδολογίες *in vivo* χρησιμοποιούνται ευρύτερα από εκείνες *in vitro*, είναι χρονοβόρες, απαιτούν μεγάλο αριθμό ψαριών και σημαντικές δαπάνες σε εξοπλισμό και ανθρώπινο δυναμικό και βασίζονται σε παραδοχές που σε πολλές περιπτώσεις εισάγουν λάθη στον προσδιορισμό της πεπτικότητας. Δεδομένων των πλεονεκτημάτων και μεινεκτημάτων που παρουσιάζει κάθε μέθοδος, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών (Alarcon et al., 1999, 2001, 2002; Chong et al., 2002; Fenerci, 2005), βασίζεται σε μεθοδολογίες *in vitro* και επιχειρεί να αναδείξει τις αναλογίες τους με τις μεθόδους *in vivo*. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μεθόδων *in vitro* είναι ότι είναι οικονομικές εύκολες στην εκτέλεση, δεν απαιτούν μεγάλη επένδυση σε εξοπλισμό, ψάρια και ανθρώπινο δυναμικό και παρέχουν γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα (Rozan et al., 1997; Alarcon, 2002).

Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες *in vitro* τεχνικές, είναι η μέτρηση της πρωτεϊνικής υδρόλυσης με χρήση του συστήματος pH-stat το οποίο αναπτύχθηκε από τους Pedersen και Eggum (1983) στα εργαστήρια της Carlsberg. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ακριβής στην πρόβλεψη της πεπτικότητας τόσο των ανθρώπινων τροφών όσο και των ζωοτροφών διαφόρων χερσαίων ζώων (Rich et al., 1980; Nocek, 1988). Οι Dimes και Haard (1994) πρότειναν τη χρησιμοποίηση της στην αξιολόγηση των σιτηρεσίων του σολομού και παρείχαν τα πρώτα πειραματικά δεδομένα για τη συσχέτιση της συγκεκριμένης μεθόδου με άλλες μεθόδους προσδιορισμού πεπτικότητας στο σολομό (Dimes et al., 1994). Η μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό του πραγματικού αριθμού πεπτιδικών δεσμών που διασπώνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, συνοψίζοντας όλες τις αντιδράσεις πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (Spellmana, 2003). Ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης (DH) ορίζεται ως ποσοστό του συνολικού αριθμού των πεπτιδικών δεσμών σε μια πρωτεΐνη και αντιπροσωπεύει τον συντελεστή πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης (Adler-Nissen, 1986). Η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πρωτονίων στο περιβάλλον των οργάνων της πέψης και τη μείωση του pH της αντίδρασης. Ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών που διασπώνται υπολογίζεται από τα γραμμο-ισοδύναμα

βάσης που απαιτούνται για να διατηρηθεί το pH σταθερό κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Adler-Nissen, 1986). Από το 1994 έως σήμερα, η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας διατροφικών πρωτεϊνών σε διάφορα είδη ιχθύων (Alarcon et al., 2001; Ezquerro, 1997), ενώ πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκε και για τη βελτίωση της παροχής διατροφικών πρωτεϊνών με μικροκάψουλες σε νεαρά άτομα τσιπούρας με τη βοήθεια πρωτεϊνικής υδρόλυσης (Alarcon et al., 1999). Η επέκταση της χρησιμοποίησης της τεχνικής pH-stat με πεπτικά ένζυμα ιχθύων και η βελτίωσή της ώστε να προσομοιάζει τις συνθήκες *in vivo* απαιτεί τη μελέτη όλων αυτών των παραγόντων που επηρεάζουν την πεπτικότητα *in vivo*.

Διατροφικά πειράματα προσδιορισμού πεπτικότητας *in vivo* σε διαφορετικές περιβαλλοντικές και βιολογικές συνθήκες, έδειξαν ότι η πεπτικότητα επηρεάζεται από τη σύνθεση και τον τρόπο επεξεργασίας των πειραματικών σιτηρεσίων, τη μέθοδο συλλογής περιττωμάτων, την πρόσληψη του σιτηρεσίου (Rust, 2002), το είδους του ιχθύος και τη δραστηριότητα των ενζύμων, τη θερμοκρασία και την αλατότητα. Ενδεικτικά, το ημερήσιο μεγαλύτερο γεύμα μειώνει τον συντελεστή φαινομενικής πεπτικότητας (ADC) για τα περισσότερα αμινοξέα και τις ολικές πρωτεΐνες στην πέστροφα (Hudon, 1985). Η πεπτικότητα των πρωτεϊνών είναι υψηλότερη στην πέστροφα στους 18°C από ότι στους 9°C έως 15°C (Cho & Slinger, 1979). Η υψηλή αλατότητα στην πέστροφα έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την αποτελεσματικότητα απορρόφησης των διατροφικών πρωτεϊνών.

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη της μεθοδολογίας pH-stat για το προσδιορισμό *in vitro* της πεπτικότητας διατροφικών πρωτεϊνών στο λαβράκι, η οποία περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης του pH, της θερμοκρασίας και της αλατότητας στο ρυθμό αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών. Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα πεπτικών ενζύμων από το λαβράκι γνωστής δραστηριότητας. Προκειμένου να προσομοιαστεί η διαφορική πρόσληψη τροφής και παραγωγή πεπτικών ενζύμων από άτομο σε άτομο, η μέθοδος περιέλαβε μετρήσεις σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων τροφής. Τέλος, όλες οι αβιοτικές και βιοτικές παράμετροι που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός μαθηματικού μοντέλου με δυνατότητα πρόγνωσης.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας προσδιορισμού της πεπτικότητας διατροφικών πρωτεϊνών *in vitro* χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα πειραματικό σιτηρέσιο (CB), που περιείχε μόνο ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεϊνών (Πίνακα 2.1). Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας περιελάμβανε δύο φάσεις:

1. Μελέτη της μεταβολής του βαθμού αυτουδρόλυσης του συγκεκριμένου σιτηρεσίου υπό κυμαινόμενο pH, θερμοκρασία και αλατότητα.
2. Μελέτη της μεταβολής του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης του συγκεκριμένου σιτηρεσίου υπό κυμαινόμενο pH, θερμοκρασία, αλατότητα και εκχύλισμα πεπτικών ενζύμων καθώς και μελέτη της επίδρασης όξινης προ-πέψης.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι γνωστό ότι επιδρούν στη διαδικασία της πέψης και στη διάρκεια των πειραμάτων κυμάνθηκαν σε επίπεδα που προσομοιάζουν τις συνθήκες *in vivo* κατά την εκτροφή του λαβρακιού στη Μεσόγειο. Επιπλέον, όλες οι μετρήσεις διενεργήθηκαν σε ένα μεγάλο εύρος αναλογίας μg διατροφικής πρωτεΐνης / U πρωτεάσης προκειμένου να προσομοιαστούν οι μεγάλες διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στον πεπτικό σωλήνα εξαιτίας της διαφοροποιημένης κατανάλωσης τροφής και παραγωγής πεπτικών ενζύμων από άτομο σε άτομο.

2.2.2 Λήψη ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων

Για την προετοιμασία εκχυλισμάτων πεπτικών ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν λαβράκια βάρους 129-407g της ιχθυοκαλλιεργητικής μονάδας Σελόντα ΑΕ, τα οποία εκτρέφονταν σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς με σιτηρέσια που περιείχαν διαφορετικής προέλευσης διατροφικές πρωτεΐνες (Πίνακας 2.2). Από τα λαβράκια απομονώνονταν ο πεπτικός σωλήνας, απομακρύνονταν ο λιπώδης και συνδετικός ιστός που τον περιβάλλει και στη συνέχεια διαχωρίζονταν το στομάχι και τα πυλωρικά τυφλά, καθαρίζονταν, εμβαπτιζόνταν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονταν στους -80 °C. Το στομάχι και τα πυλωρικά τυφλά αποτελούσαν πηγή όξινων και αλκαλικών πρωτεασών, αντίστοιχα.

Τα δείγματα στομάχου ομογενοποιήθηκαν μηχανικά (1:10 w/v) σε ddH₂O, ενώ τα πυλωρικά τυφλά (100 mg/ ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH=7,5. Το υπερκείμενο στρώμα απομονώθηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 30 min στους 4 °C και αποθηκεύθηκε στους -80 °C για περαιτέρω ενζυμική ανάλυση. Όλη η διαδικασία προετοιμασίας των ενζυμικών εκχυλισμάτων, πραγματοποιήθηκε αυστηρά στους 0 – 4 °C, ώστε να αποφευχθούν τυχόν απώλειες της ενζυμικής δραστηριότητας.

Η συγκέντρωση ολικής διαλυτής πρωτεΐνης των ενζυμικών εκχυλισμάτων, προσδιορίστηκε με την μέθοδο (Lowry et al., 1951), βάσει πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης από βοδινό ορό (BSA).

2.2.3 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Η μέτρηση της δραστηριότητας των ολικών όξινων πρωτεασών του στομάχου οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την όξινη προ-πέψη, έγινε σύμφωνα με τον Anson (1938), με χρήση 0,5 % αιμοσφαιρίνης ως υπόστρωμα, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mM glycine-HCL, pH=2,0. Η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν

στα πειράματα ενζυμικής υδρόλυσης, μετρήθηκε σύμφωνα με τον García-Carreño (1992), με χρήση 1,5 % αζοκαζεΐνης ως υπόστρωμα, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH=9,0. Η απορρόφηση του υπερκείμενου καταγράφονταν στα 280nm και η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως 1 μg τυροσίνης, το οποίο απελευθερωνόταν κάθε λεπτό, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 1280/M/cm.

Η δραστηριότητα της θρυψίνης προσδιορίστηκε με χρήση 0,5 mM BAPNA ως υπόστρωμα, σε 50 mM Tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα, pH=8,2 και με 10 mM CaCl₂, στα 405 nm (Bernard et al., 1961). Μια μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως 1 nmol *p*-nitroanilide το οποίο ελευθερώνεται ανά λεπτό χρησιμοποιώντας συντελεστή απορρόφησης 8800 M/cm.

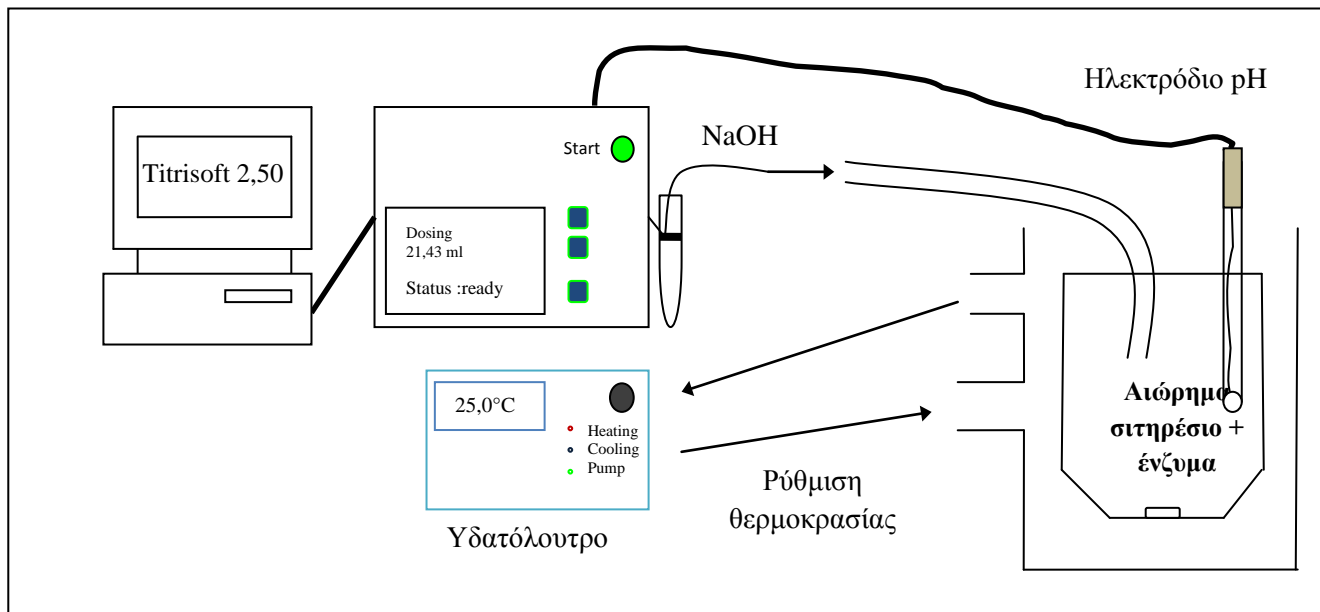
Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Asgeirsson και Bjarnason (1991), καταγράφοντας την υδρόλυση 0,5 mM BTEE σε 44,4 mM Tris-HCl ρυθμιστικού διαλύματος, pH=7,8 με 55,5 mM CaCl₂ στα 256 nm. Μια μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως 1 nmol BTEE που υδρολύεται ανά λεπτό χρησιμοποιώντας το συντελεστή απορρόφησης 964 M/cm.

Η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α μετρήθηκε όπως περιγράφεται από τους Folk και Schirmer (1963), χρησιμοποιώντας 0,5 mM hippuryl-L-phenylalanine ως υπόστρωμα σε 0,025 M Tris-HCl ρυθμιστικού διαλύματος, pH=7,5 με 0,5 M NaCl στα 254 nm. Η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Β μετρήθηκε με 0,5 mM hippuryl-L-arginine ως υπόστρωμα σε 0,025 M Tris-HCl ρυθμιστικού διαλύματος, pH=7,65, το οποίο περιείχε 0,1M NaCl στα 254 nm (Folk et al., 1960). Μια μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως 1 pmol ιππουρικού οξέως που απελευθερώνεται ανά λεπτό χρησιμοποιώντας το συντελεστή ειδικής απορρόφησης 360 M/cm.

Όλες οι μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις στους 25 °C. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η ειδική ενζυμική δραστηριότητα ως U/mg πρωτεΐνης.

Πίνακας 2.1: Εκατοστιαία σύνθεση και ολική σύσταση του πειραματικού σιτηρεσίου λαβρακιού CB (Πηγή : ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε)

Ιχθυάλευρο	57,8
Φωσφορικό διασβέστιο	1,0
Αλεύρι	24,8
Ιχθυέλαιο	14,8
Βιταμίνες	0,3
Νερό	0,3
Ολική σύσταση επί ξηρού (%)	
Ξηρό υλικό	91,04
Πρωτεΐνη	46,81
Τέφρα	11,54
Λίπος	22,19



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος pH-stat.



Εικόνα 2.2.: Φωτογραφία του συστήματος pH-stat.

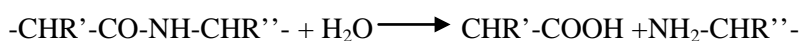
2.2.4 Προετοιμασία διατροφικής πρωτεΐνης (CB)

Με τη χρήση γουδιού έγινε μηχανική λυοτρίβιση του σιτηρεσίου CB ώστε να εξασφαλιστεί η εύκολη αιώρησή του στο νερό. Το λυοτριμμένο σιτηρέσιο αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του σιτηρεσίου CB προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl κατά την οποία υπολογίζεται το συνολικό αζωτούχο περιεχόμενο του δείγματος και στη συνέχεια μετατρέπεται σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο χρησιμοποιώντας το συντελεστή 6,25. Η μέθοδος βασίζεται στην πέψη των πρωτεϊνών με πυκνό H₂SO₄ στους 460 °C για 1h. Κατά την πέψη το πρωτεϊνικό άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία με τη μορφή όξινου θεικού αμμωνίου (NH₄HSO₄). Στη συνέχεια προστίθεται πυκνό υδροξείδιο του νατρίου (NaOH, 60% w/v) που οδηγεί σε απελευθέρωση της αμμωνίας (NH₃), η οποία με απόσταξη συλλέγεται σε κορεσμένο διάλυμα βορικού οξέος (H₃BO₃) και ακολουθεί τιτλοδότηση με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0,1N. Η ποσότητα του σιτηρεσίου που περιείχε κάθε φορά την επιθυμητή ποσότητα διατροφικών πρωτεϊνών (0,5 - 50 μg) προσδιορίζονταν βάση του πρωτεϊνικού του περιεχομένου με ζυγαριά ακριβείας.

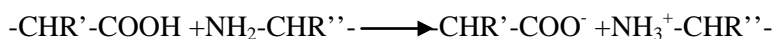
2.2.5 Υπολογισμός του βαθμού αυτοϋδρόλυσης (BL) και ενζυμικής υδρόλυσης (DH) των διατροφικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο του pH-stat

Η μέθοδος pH –stat επιτρέπει τον προσδιορισμό του βαθμού υδρόλυσης των πρωτεϊνών, ο οποίος εκφράζεται ως η % αναλογία μεταξύ του αριθμού των πεπτιδικών δεσμών που διασπώνται και του ολικού αριθμού πεπτιδικών δεσμών στο υπό μελέτη υπόστρωμα και είναι ευθέως ανάλογος της ποσότητας βάσεως (NaOH) που καταναλώνεται για να διατηρηθεί το pH σταθερό στην επιθυμητή τιμή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Diniz & Martin, 1996). Η χημική αρχή της μεθόδου του pH-stat, φαίνεται παρακάτω:

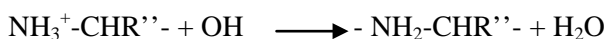
1. Διάσπαση πεπτιδικών δεσμών από πρωτεάσες



2. Ανταλλαγή πρωτονίων



3. Τιτλοδότηση αμινοομάδων



Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10ml, μέσα σε εσωτερικό δοχείο αντίδρασης με θερμορρυθμιζόμενο περίβλημα (Εικόνα 2.1). Στον όγκο αυτό διαλυόταν διαδοχικά αυξανόμενη ποσότητα του πειραματικού σιτηρεσίου (0,5, 0,75, 1, 1,5, 3, 5, 10,

30, 50 μg διατροφικής πρωτεΐνης). Το pH του αιωρήματος ρυθμιζόταν στην επιθυμητή τιμή και παρέμενε σταθερό σε όλη την διάρκεια της αντίδρασης, με την συνεχή προσθήκη βάσεως NaOH 0,01N. Η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή με την βοήθεια υδατόλουτρου συνδεδεμένου με το δοχείο της αντίδρασης και το αιώρημα βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση από μαγνητικό αναδευτήρα. Η υδρόλυση διακόπτονταν στα 60min. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή *Titroline alpha plus*, (Schott). Με τη χρήση του προγράμματος Titrisoft του συστήματος pH-stat, ήταν δυνατή η παρατήρηση της πορείας των εξής παραμέτρων της αντίδρασης: συνολική και ανά 5 δευτερόλεπτα προστιθέμενη ποσότητα NaOH, μεταβολή του επιπέδου pH της αντίδρασης, χρόνος της αντίδρασης, τεχνικά θέματα όπως ονομασία των δειγμάτων, αλλαγή επιπέδου pH, δημιουργία μεθόδων. Κάθε μέτρηση με την αντίστοιχη συγκέντρωση σιτηρεσίου επαναλήφθηκε τρεις φορές. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής υδρόλυσης, στην αντίδραση προστίθεντο και ενζυμικό εκχύλισμα από τα πυλωρικά τυφλά που περιείχε 1U ολικών αλκαλικών πρωτεασών. Ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών (h) που διασπώνταν στη διάρκεια της αντίδρασης υπολογίστηκε από το ισοδύναμο υδρόλυσης του όγκου του πρότυπου διαλύματος NaOH 0,01N που απαιτούνταν προκειμένου να διατηρηθεί το pH του μίγματος της αντίδρασης σταθερό σύμφωνα με την εξίσωση:

$$h = [B \times (1/\alpha) \times N_b] / [M \times (S/100)]$$

όπου:

B (ml) είναι ο όγκος του NaOH το οποίο καταναλώνεται σε 60 λεπτά κατά την ενζυμική υδρόλυση ή την αυτουδρόλυση

N_b είναι η κανονικότητα του διαλύματος τιτλοδότησης (NaOH),

M (g) είναι η ποσότητα του σιτηρεσίου στην αντίδραση,

S (%) είναι η περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε πρωτεΐνη, και

$\alpha = 10^{\text{pH}-\text{pK}} / (1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}})$ είναι ο μέσος βαθμός διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών

Ο βαθμός πρωτεϊνικής υδρόλυσης (**DH**) υπολογίστηκε από την παράμετρο h σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{DH (\%)} = (h / h_{\text{tot}}) \times 100$$

όπου το **h_{tot}** είναι ο συνολικός αριθμός πεπτιδικών δεσμών της πρωτεΐνης. Για καθορισμένες πρωτεΐνες ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών εκτιμάται από το μέσο μοριακό βάρος των αμινοξικών καταλοίπων που υπολογίζεται από την σύσταση των αμινοξέων. Εάν η αμινοξική σύσταση δεν είναι γνωστή, χρησιμοποιείται η μέση τιμή 8 meq/ g πρωτεΐνης.

Τα πειράματα που σχεδιάστηκαν για τον προσδιορισμό της επίδρασης διαφόρων περιβαλλοντολογικών και βιολογικών παραγόντων στη μέτρηση του βαθμού αυτοϋδρόλυσης (BL) και ενζυμικής υδρόλυσης (DH) του σιτηρεσίου CB ήταν τα εξής:

Πείραμα 1: επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Ο βαθμός αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης του σιτηρεσίου CB προσδιορίστηκε σε τρία διαφορετικά pH (6, 7 & 8), τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (15 °C, 20 °C & 25 °C) και τρεις διαφορετικές αλατότητες (0 ‰, 15 ‰ & 35 ‰). Εξετάστηκαν 31 διαφορετικοί συνδυασμοί pH, θερμοκρασίας και αλατότητας.

Για τον προσδιορισμό του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε ένα συλλεκτικό ενζυμικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε από λαβράκια, τα οποία είχαν σιτιστεί με το ίδιο σιτηρέσιο (RH09) και είχαν το ίδιο διατροφικό ιστορικό.

Για τις μετρήσεις σε κυμαινόμενη αλατότητα παρασκευάστηκε τεχνητό θαλασσινό νερό αλατότητας 35 ‰, η ποιοτική και ποσοτική σύσταση του οποίου σε άλατα προσομοίαζε εκείνη του θαλασσινού νερού. Το τεχνητό θαλασσινό νερό περιείχε:

- 468 mmol NaCl \ L
- 10,4 mmol CaSO₄ \ L
- 9,97 mmol KHSO₄ \ L
- 33,3 mmol MgCl₂ \ L
- 7,73 mmol NaSO₄ \ L

Τα άλατα διαλύθηκαν σε αποσταγμένο νερό με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα και καθ' όλη τη χρονική διάρκεια χρήσης του, αναδεύονταν καθημερινά για να αποφευχθεί η κατακρήμνιση των αλάτων. Νερό αλατότητας 15 ‰, παρασκευάστηκε με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος 35 ‰.

Πείραμα 2: Επίδραση του ενζυμικού προφίλ του εκχυλίσματος πεπτικών ενζύμων στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων

Λαβράκια εκτράφηκαν σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς στην ιχθυοκαλλιεργητική μονάδα Σελόντα με τα σιτηρέσια RH09, RH10, RH11, RH17, RH18 και RH19 (Πίνακας 2.2), τα οποία περιείχαν εναλλακτικές πηγές διατροφικών πρωτεϊνών. Στο τέλος της περιόδου εκτροφής συλλέχθηκαν πυλωρικά τυφλά και προετοιμάστηκαν εκχυλίσματα πεπτικών ενζύμων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2. Σε κάθε ενζυμικό εκχύλισμα προσδιορίστηκαν οι δραστηρότητες των πεπτικών πρωτεασών όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.3.

Στη διάρκεια αυτού του πειράματος συγκρίθηκε ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης του πειραματικού σιτηρεσίου CB με τη χρήση των διαφορετικών ενζυμικών εκχυλισμάτων. Σε

όλες τις αντιδράσεις οι παράμετροι παρέμειναν σταθερές: θερμοκρασία 25 °C, pH 8 και αλατότητα 0 ‰. Η ποσότητα του ενζυμικού εκχυλίσματος που προστέθηκε σε κάθε αντίδραση ήταν διαφορετική και αντιστοιχούσε σε 1 U ολικών αλκαλικών πρωτεασών.

Πίνακας 2.2.: Εκατοστιαία σύνθεση, και ολική σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκτροφή λαβρακιών (Πηγή: ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε, Nikolopoulou, 2008)

	RH09	RH10	RH11	RH17	RH18	RH19
Ιχθυάλευρο	34,6	34,6	34,6	35,0	35,0	35,0
Σόγια	7,4	7,4	-	15,9	13,7	11,4
Ρεβίθι	-	15,0	20,2	-	-	-
Μπιζέλι	14,8	-	-	-	-	-
Φύτρο σπέρματος χαρουπιού	-	-	-	5,0	10,0	15,0
Αλεύρι	-	-	-	5,5	5,5	5,6
Ηλιόλευρο	14,9	14,9	14,9	12,8	10,5	9,3
Γλουτένη	6,9	6,9	6,9	7,5	7,5	7,4
Γλουτένη σίτου	3,8	3,4	6,0	-	-	-
Ιχθυέλαιο	9,9	9,9	9,9	9,3	9,3	8,3
Σογιέλαιο	6,1	6,1	5,9	7,7	7,6	7,5
Βιταμίνες	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Νερό	0,3	0,3	0,3	1	0,6	0,2
Ολική σύσταση επί ξηρού (%)						
Ξηρό υλικό	92,29	92,38	92,07	91,71	92,29	92,87
Πρωτεΐνη	46,96	48,17	47,63	43,01	43,00	43,00
Τέφρα	9,61	9,47	8,97	8,26	8,31	8,36
Λίπος	22,97	25,12	25,2	20,94	21,02	21,00

Πείραμα 3: επίδραση της όξινης προ-πέψης στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Προκειμένου να προσομοιωθεί η λειτουργία του στομάχου, της αλκαλικής ενζυμικής υδρόλυσης του σιτηρεσίου CB, προηγήθηκε όξινη προ-πέψη. Τα διαλύματα της διατροφικής πρωτεΐνης επωάζονται σε θερμοκρασία 25 °C σε συνεχή ανάδευση για 60 min παρουσία 1U ολικών όξινων πρωτεασών που είχαν εκχυλισθεί από το στομάχι λαβρακιών που είχαν διατραφεί με το σιτηρέσιο RH09. Το pH της αντίδρασης ρυθμίζονταν με προσθήκη HCl 0,1N σε επίπεδο pH 3 ή pH 4. Στο τέλος των αντιδράσεων προ-πέψης, το pH ρυθμίζονταν στο 8 με χρήση NaOH και ακολουθούσε άλλη μια ώρα αλκαλικής ενζυμικής πέψης με προσθήκη 1 U ολικών αλκαλικών πρωτεασών όπως περιγράφεται προηγουμένως.

2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΞΙΣΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα STATGRAPHICS Centurion XV, έκδοση 15.2.06 για Windows. Εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way Anova), στους διάφορους

παράγοντες των οποίων εξετάζεται η επίδραση στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης της διατροφικής πρωτεΐνης. Η εκάστοτε, αλλαγή του pH, της θερμοκρασίας, της αλατότητας, των επιπέδων δραστηριότητας των πεπτικών πρωτεασών σε εκχυλίσματα που προέρχονται από λαβράκια με διαφορετικό διατροφικό ιστορικό και η όξινη προ-πέψη χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητοί παράγοντες στην πρώτη κατεύθυνση μεταβλητών παραγόντων. Η ποσότητα του σιτηρεσίου στην αντίδραση, εκφρασμένη ως ποσότητα διατροφικής πρωτεΐνης / U πρωτεάσης χρησιμοποιήθηκε ως μεταβλητός παράγοντας στη δεύτερη κατεύθυνση. Και οι δύο κατευθύνσεις αναλύθηκαν χωριστά για την ενζυμική υδρόλυση και την αυτοϋδρόλυση. Έτσι σε κάθε περίπτωση έγινε σύγκριση των διαφόρων ποσοτήτων σιτηρεσίων και ενός παράγοντα. Ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (One Way Anova) χρησιμοποιήθηκε μόνο κατά την στατιστική ανάλυση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου και για τις αναλογίες συγκέντρωσης σιτηρεσίου/ U ενζυμικής δραστηριότητας. Στα διάφορα επίπεδα σημαντικότητας γίνονται συγκρίσεις των μέσων όρων των διάφορων παραγόντων σε ζεύγη (κριτήριο LSD, *Least Significant Difference*).

Για να υπόκειται μια μαθηματική υπόθεση σε στατιστικές επεξεργασίες και αναλύσεις, είναι απαραίτητη προϋπόθεση τα δεδομένα αυτής της υπόθεσης να ακολουθούν κανονική κατανομή, να διανέμονται ελεύθερα γύρω από το μέσο όρο, να μην επιβάλλονται όρια. Προφανώς αυτό δεν ισχύει για το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης (DH%) των διαφόρων σιτηρεσίων, ούτε για το βαθμό αυτοϋδρόλυσης, οι οποίοι δεν μπορεί να είναι μικρότεροι από το μηδέν, ούτε μεγαλύτεροι από τους 100. Όλα τα δεδομένα ανήκουν σε ποσοστιαίο όριο, για αυτό έγινε μετατροπή των αρχικών δεδομένων πριν την στατιστική ανάλυση σε $\arcsin(\chi)^{1/2}$ τιμές, οι οποίες κυμαίνονται από -1 ως +1. Δίνοντάς τους περισσότερη θεωρητική ελευθερία να διαφέρουν, για αυτή την μετατροπή χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Microsoft® Office Excel® 2007 (12.0.6331.5000) SP1.

Το ίδιο πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε στα ακόλουθα:

- Στον υπολογισμό της ποσότητας του NaOH που καταναλώθηκε σε κάθε αντίδραση για τη διατήρηση του pH σε σταθερή τιμή, μετά από την μεταφορά των πειραματικών δεδομένων από το πρόγραμμα Titrisoft 2,50 του pH-stat.
- Στην παρουσίαση των σχημάτων των πειραματικών δεδομένων.
- Στον υπολογισμό των δραστηριοτήτων των διαφόρων ενζύμων.

Για τους προβλεπόμενους βαθμούς αυτοϋδρόλύσεων και ενζυμικών υδρόλύσεων από την αναπτυσσόμενη εξίσωση χρησιμοποιήθηκε το γραφιστικό πρόγραμμα Grapher version 7.0.1870 έκδοσης του 2007, το οποίο διαθέτει ευελιξία στην παράστασή των μη γραμμικών εξισώσεων.

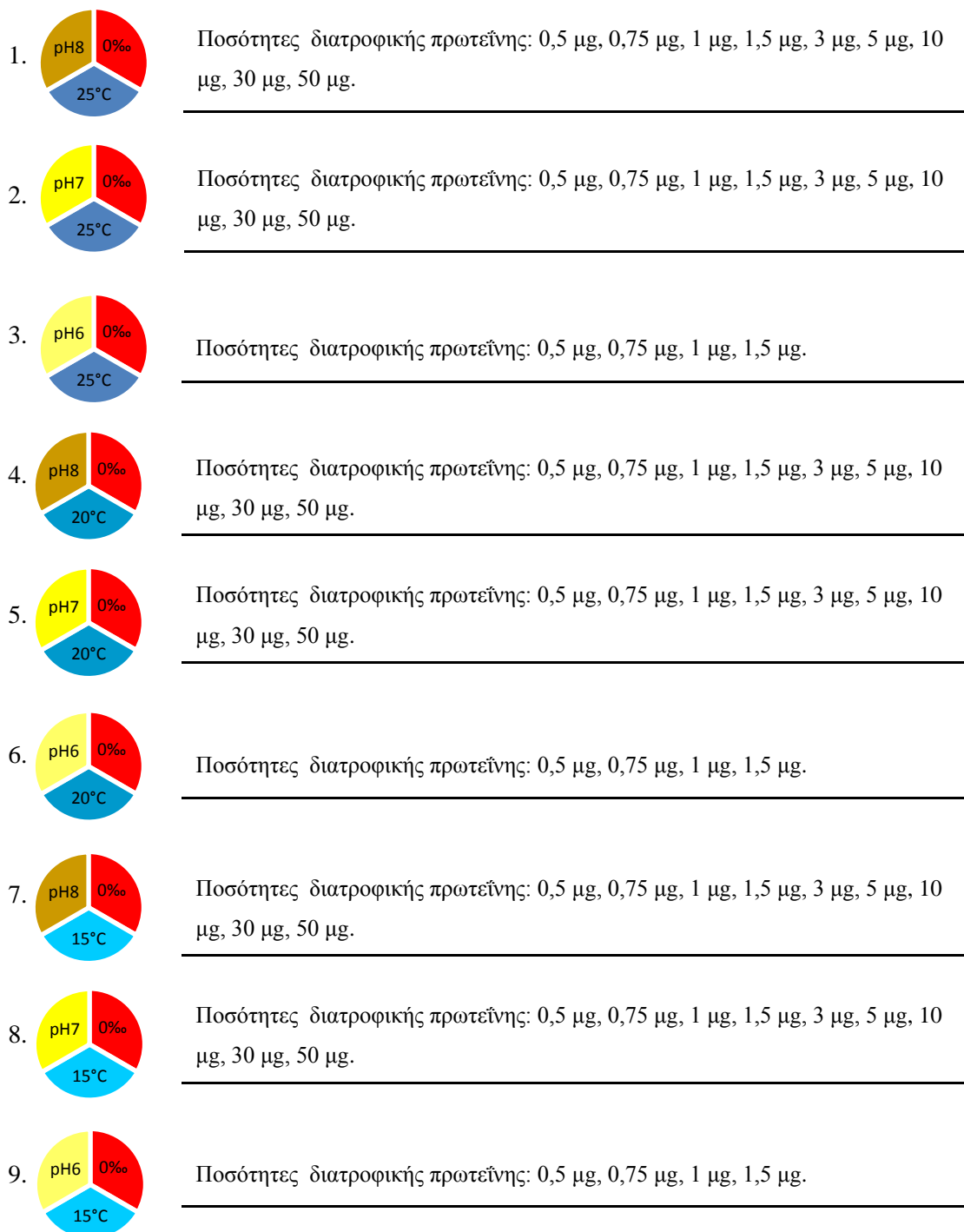
Για την ανάπτυξη της εξίσωσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 για Windows, για την εύρεση και τη σύγκριση εξισώσεων, την ταξινόμηση πειραματικών βαθμών, την εύρεση σταθερών τιμών, τον προσδιορισμό της κατανομής των πειραματικών

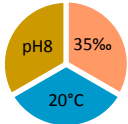
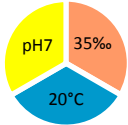
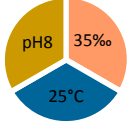
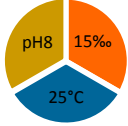
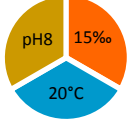
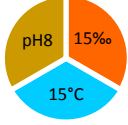
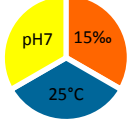
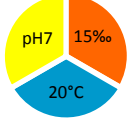
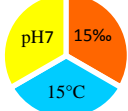
δεδομένων, τον υπολογισμό της διαφοράς μεταξύ των προβλεπόμενων βαθμών και των πειραματικών βαθμών. Επίσης ο υπολογισμός του συντελεστή μη γραμμικών συσχετίσεων έγινε σύμφωνα με την αναπτυσσόμενη εξίσωση, καθώς επιλέχθηκε από μια σειρά εξισώσεων ως η άριστη εξίσωση η οποία υπολογίζει το συντελεστή συσχέτισης των πειραματικών δεδομένων με ακρίβεια.

2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βαθμός Αυτοϋδρόλυσης

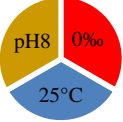
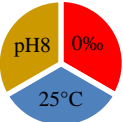
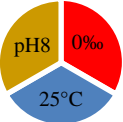
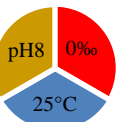
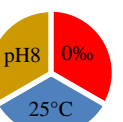
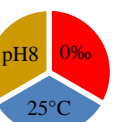
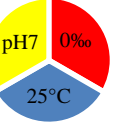
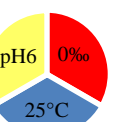
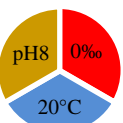
Η μεταβολή του βαθμού αυτοϋδρόλυσης του πειραματικού σιτηρεσίου CB μελετήθηκε υπό διαφορετικούς συνδυασμούς pH, θερμοκρασίας και αλατότητας, όπως παρουσιάζεται συνοπτικά στο διάγραμμα εργασίας που ακολουθεί.

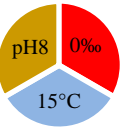
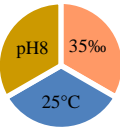
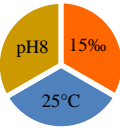
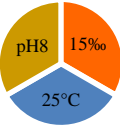


10.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3, μg 5 μg 30 μg.
-
11.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 30 μg.
-
12.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg.
-
13.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 5 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg.
-
14.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 5 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg.
-
15.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 30 μg.
-
16.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 1 μg, 1,5 μg, 5 μg, 10 μg, 30 μg.
-
17.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 30 μg.
-
18.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 30 μg.
-

Βαθμός Ενζυμικής Υδρόλυσης

Η μεταβολή του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης του πειραματικού σιτηρεσίου CB μελετήθηκε υπό διαφορετικούς συνδυασμούς pH, θερμοκρασίας και αλατότητας, όπως παρουσιάζεται συνοπτικά στο διάγραμμα εργασίας που ακολουθεί

1.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH11
2.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH19
3.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH18
4.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5-0,75-1 μg, 1 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH17
5.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH10
6.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09
7.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09
8.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09
9.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09

10.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09
-
11.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09
-
12.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH09
-
13.  Ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης: 0,5 μg, 0,75 μg, 1 μg, 1,5 μg, 3 μg, 10 μg, 30 μg, 50 μg. Ένζυμα πυλωρικών τυφλών από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο RH10 και από ένζυμα στομάχου από ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο CB (σε pH3, pH4)
-

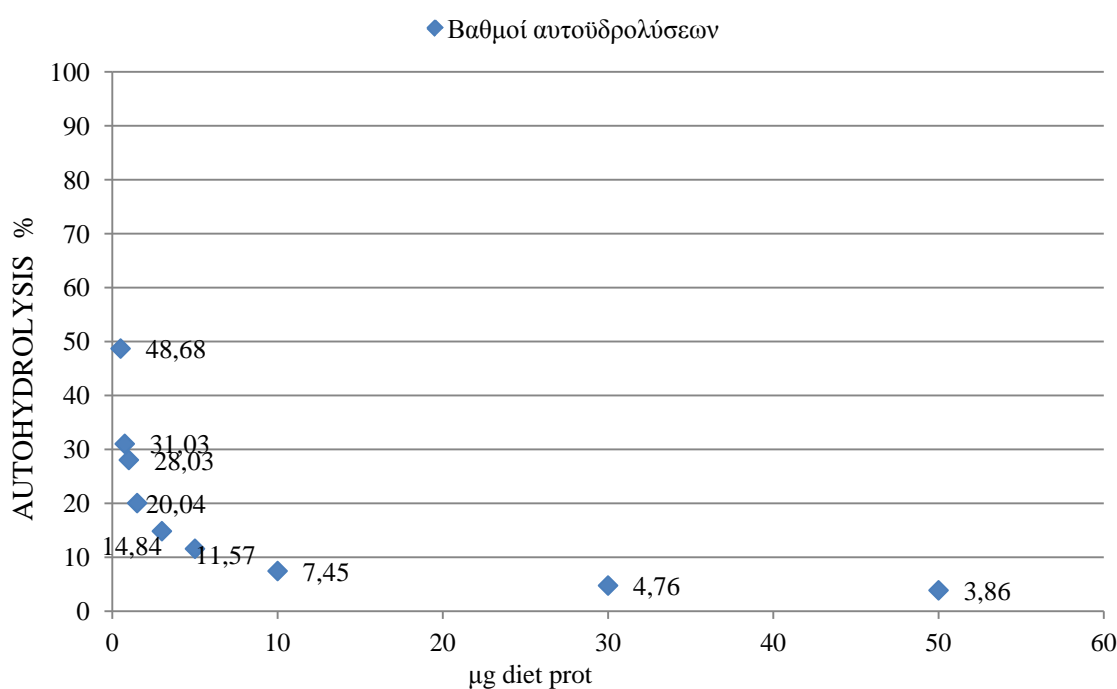
2.4.1. Στατιστική επεξεργασία

2.4.1.1. Βαθμός Αυτοϋδρόλυσης

Παράμετρος 1: επίδραση της συγκέντρωσης σιτηρεσίου CB (ως υπόστρωμα) στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Κατά την στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, τα οποία ταξινομήθηκαν ανάλογα με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (One Way Anova). Υπήρξαν στατιστικές διαφορές σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%, για την εκάστοτε αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου.

Τα αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD, έδειξαν διαφορές μεταξύ όλων των ζευγών με εξαίρεση τα ζεύγη με αυξημένες ποσότητες σιτηρεσίου (10 μg , 30 μg , 50 μg διατροφικής πρωτεΐνης). Καλύτερες τιμές αυτοϋδρόλυσεων παρατηρήθηκαν στη μικρότερη συγκέντρωση σιτηρεσίου 0,5 μg διατροφικής πρωτεΐνης. Η κάθε αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου οδηγούσε σε σταδιακή μείωση του βαθμού αυτοϋδρόλυσης (Εικόνα 2.3.).



Εικόνα 2.3.: Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Πίνακας 2.3.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K = σειρά με την οποία οι συγκεντρώσεις του σιτηρεσίου έδωσαν καλύτερους βαθμούς αυτοϋδρόλυσεων

	0,5	0,75	1	1,5	3	5	10	30	K
0,5									1
0,75	***								2
1	***	-							3
1,5	***	***	***						4
3	***	***	***	*					5
5	***	***	***	***	-				6
10	***	***	***	***	**	-			7
30	***	***	***	***	***	**	-		8
50	***	***	***	***	***	**	-	-	9

Παράμετρος 2: επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Στην στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ανάλυσης διασποράς με δυο παράγοντες (Two Way ANOVA) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης, λόγω της ισχυρής συσχέτισης αυτής της επίδρασης με την επίδραση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου (Πίνακας 2.4.). Σε συμφωνία με το πείραμα 1, η συγκέντρωση του σιτηρεσίου είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης. Η αλληλεπίδραση του επιπέδου pH με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική. Η εφαρμογή της ανάλυσης έγινε σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %.

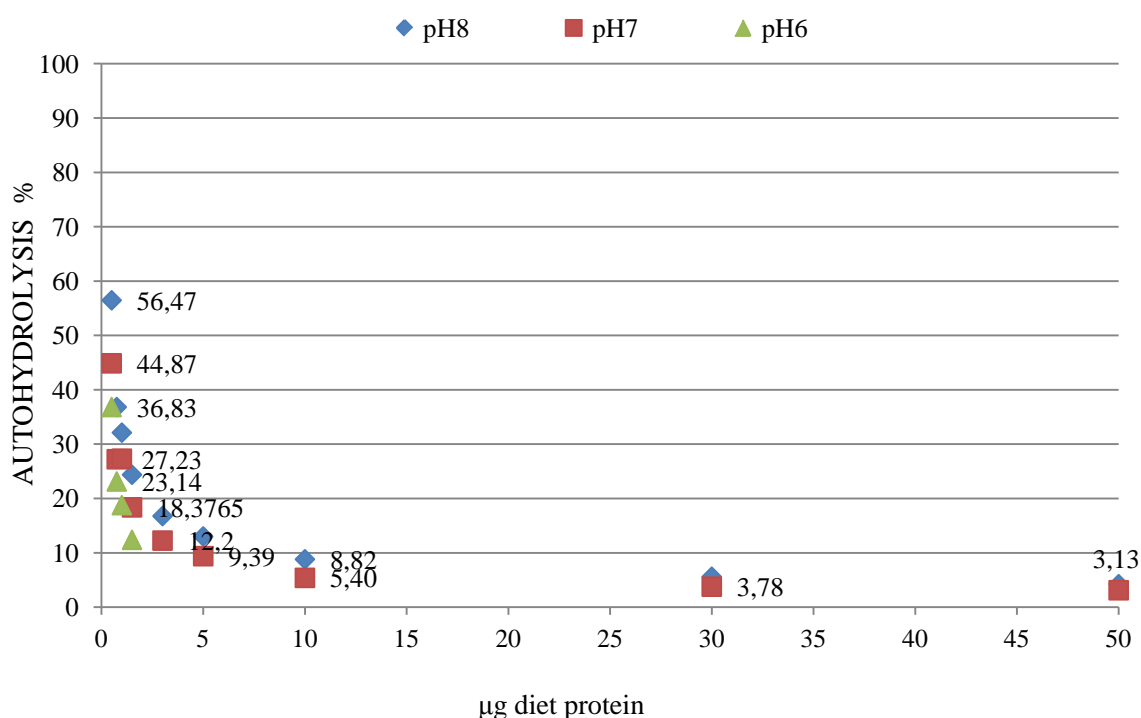
Η επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης είναι εμφανής στις μικρές συγκεντρώσεις σιτηρεσίου (Εικόνα 2.4.). Αυτή η επίδραση μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου. Έτσι στις μεγάλες συγκεντρώσεις αυτή η επίδραση ήταν μικρή έως ανύπαρκτη. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (Πίνακας 2.5.) για τη σύγκριση των μέσων όρων των ζευγών των επιπέδων pH σε αλληλεπίδραση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου, αποδείχθηκε ότι υπάρχουν στατιστικές διαφορές σε όλους τους διαφορετικούς συνδυασμούς οι οποίοι εξετάστηκαν, σε κάθε επίπεδο σημαντικότητας.

Πίνακας 2.4.: Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %

Πηγή παραλλακτικότητας	pH	Συγκέντρωση σιτηρεσίου	pH * Συγκέντρωση σιτηρεσίου
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές	-	*	*

Πίνακας 2.5.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD
K = Σειρά με την οποία τα επίπεδα pH έδωσαν καλύτερους βαθμούς αυτοϋδρόλυσεων

Επίπεδο pH	pH8	pH7	K
pH8			1
pH7	***		2
pH6	***	***	3



Εικόνα 2.4.: Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στα διάφορα επίπεδα pH σε σχέση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Στα πειράματα του επιπέδου pH 6 το πρωτεϊνικό υπόστρωμα αυξήθηκε μόνο έως 1,5 µg διατροφικής πρωτεΐνης, καθώς ήταν αδύνατη η μέτρηση του βαθμού αυτοϋδρόλυσης, λόγω της υπερβολικής κατανάλωσης αλκαλικού διαλύματος (NaOH) το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την υπερχειλίση του μείγματος από το δοχείο της αντίδρασης του συστήματος pH-stat.

Παράμετρος 3: επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Κατά τη στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two Way ANOVA) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης, ενώ η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ήταν στατιστικώς σημαντική σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (Πίνακας 2.6.). Η επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης ήταν εμφανής στις

μικρές συγκεντρώσεις σιτηρεσίου, όπως και το επίπεδο pH (Εικόνα 2.5.). Αυτή η επίδραση μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (Πίνακας 2.7.) για τη σύγκριση των μέσων όρων του κάθε ζεύγους της θερμοκρασίας σε αλληλεπίδραση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου, απεδείχθη ότι υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο στο συνδυασμό της θερμοκρασίας 25 °C με την θερμοκρασία 15°C.

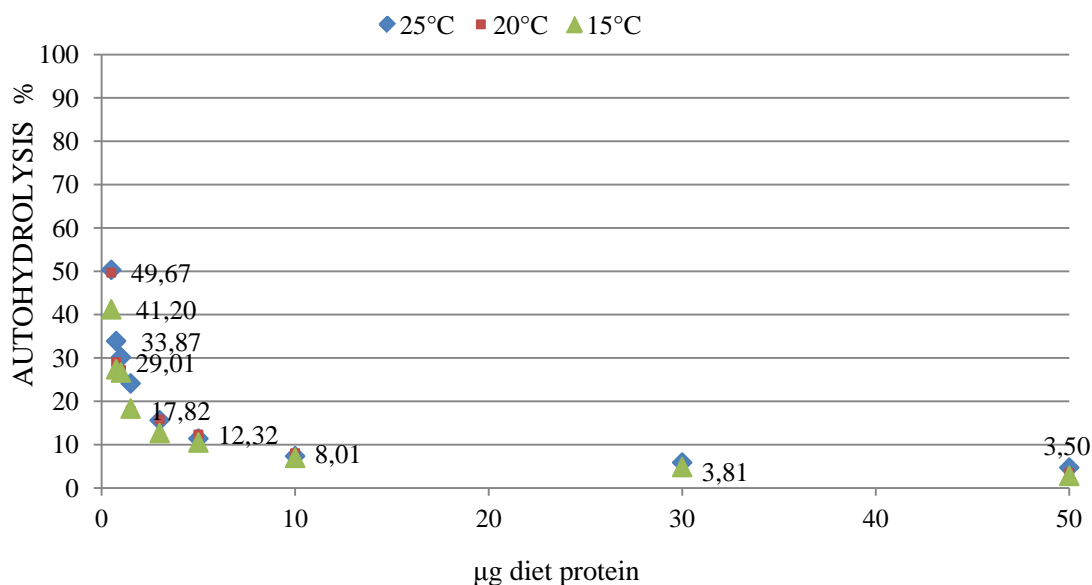
Πίνακας 2.6.: Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες της θερμοκρασίας σε επίπεδο σημαντικότητας 95 %

Πηγή παραλλακτικότητας	Θερμοκρασία	Συγκέντρωση σιτηρεσίου	Θερμοκρασία * Συγκέντρωση σιτηρεσίου
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές	-	*	*

Πίνακας 2.7.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K= Σειρά με την οποία οι θερμοκρασίες έδωσαν καλύτερους βαθμούς αυτοϋδρολύσεων

Θερμοκρασία	25 °C	20 °C	K
25 °C			1
20 °C	-		2
15 °C	***	-	3



Εικόνα 2.5.: Βαθμοί αυτοϋδρολύσεων των διατροφικών πρωτεϊνών στις διάφορες θερμοκρασίες σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 4: επίδραση της αλατότητας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Για τη στατιστική επεξεργασία της επίδρασης της αλατότητας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διασποράς με δυο παράγοντες. Όλα τα δεδομένα ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το ποσοστό αλατότητας, 0 ‰, 15 ‰, 35 ‰ και τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση ($P < 0,05$) της αλατότητας, όπως και της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου αλλά και στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση της αλατότητας με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (Πίνακας 2.8.). Η επίδραση της αλατότητας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου, ενώ στις μεγάλες συγκεντρώσεις ήταν απύσχα όπως συνέβη και με το pH και τη θερμοκρασία. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της αλατότητας 15 ‰ και 35 ‰ αντίθετα με τα υπόλοιπα ζεύγη (Πίνακας 2.9.).

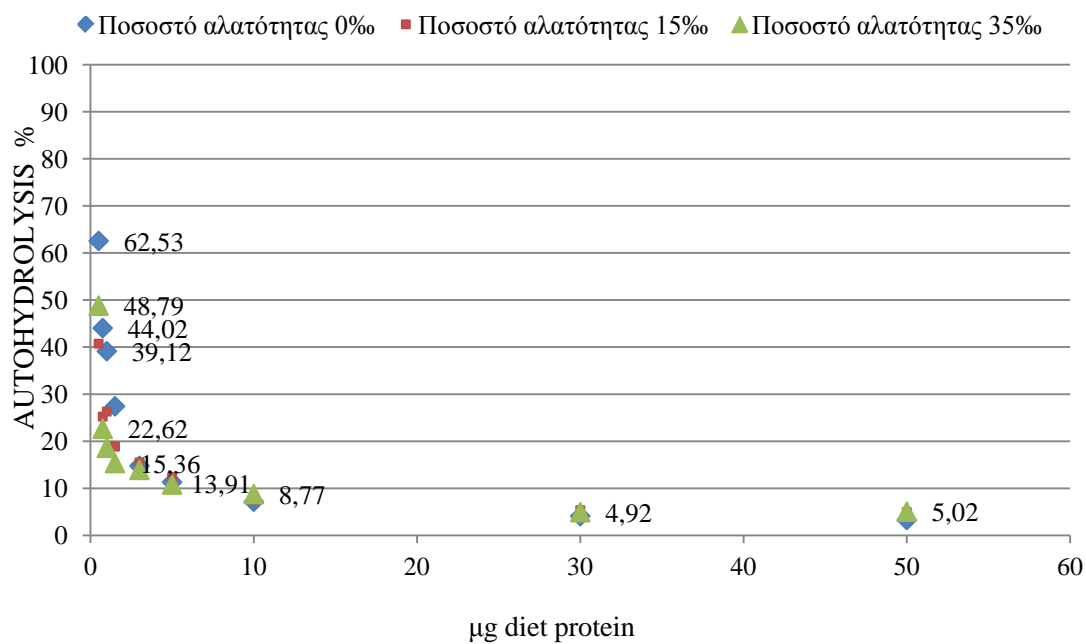
Πίνακας 2.8.: Ανάλυση διακύμανσης με δύο παράγοντες του ποσοστού της αλατότητας σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %

Πηγή παραλλακτικότητας	Αλατότητας	Συγκέντρωση σιτηρεσίου	A.* Συγκέντρωση σιτηρεσίου
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές	*	*	*

Πίνακας 2.9.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K= Σειρά με την οποία τα ποσοστά της αλατότητας έδωσαν καλύτερους βαθμούς αυτοϋδρόλυσεων

Αλατότητα	0 ‰	15 ‰	K
0 ‰			1
15 ‰	***		2
35 ‰	***	-	3



Εικόνα 2.6.: Βαθμοί αυτοϋδρολύσεων των διατροφικών πρωτεϊνών σε διαφορετικά ποσοστά αλατότητας σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

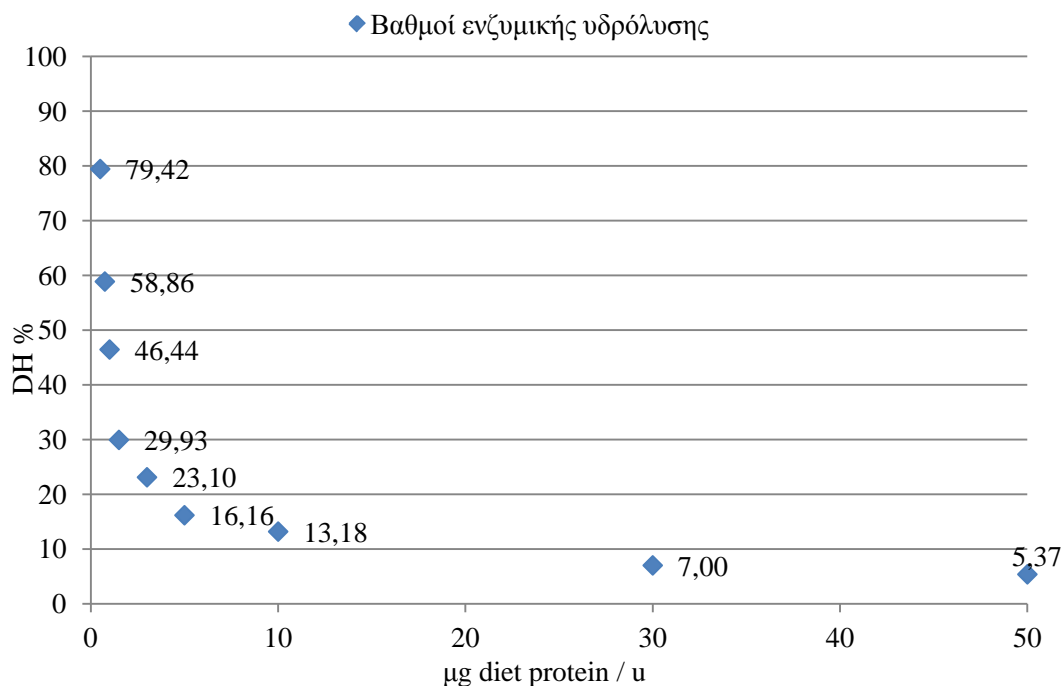
2.4.1.2. Βαθμός Ενζυμικής Υδρόλυσης

Κατά τη στατιστική επεξεργασία τα πειραματικά δεδομένα των βαθμών της ενζυμικής υδρόλυσης ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την αναλογία συγκέντρωσης σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών. Χρησιμοποιώντας ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (One Way Anova), παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 % για τον παράγοντα της αναλογίας συγκέντρωσης σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD, έδειξαν διαφορές μεταξύ των περισσότερων ζευγών, ειδικά στα ζεύγη μικρών αναλογιών ποσότητας σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας (Πίνακας 2.10.). Καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης, έδωσε η μικρότερη συγκέντρωση σιτηρεσίου 0,5 μg διατροφικής πρωτεΐνης / U. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου μειώνονταν σταδιακά ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης (Εικόνα 2.7.).

Πίνακας 2.10.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K = Σειρά με την οποία συγκεντρώσεις έδωσαν καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης

μg διατροφικής πρωτεΐνης / U ολικών αλκαλικών πρωτεασών	0,5	0,75	1	1,5	3	5	10	30	K
0,5									1
0,75	***								2
1	***	***							3
1,5	***	***	***						4
3	***	***	***	*					5
5	***	***	***	-	-				6
10	***	***	***	***	**	-			7
30	***	***	***	***	***	-	-		8
50	***	***	***	***	***	-	*	-	9



Εικόνα 2.7.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με την αναλογία της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 2: επίδραση του pH στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες για τον παράγοντα του επιπέδου pH και τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (Πίνακας 2.11.). Σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %, δεν υπήρχαν στατιστικές σημαντικές διαφορές για τον παράγοντα pH πράγμα το οποίο μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό των παρατηρήσεων N μεταξύ των επιπέδων pH. Η αλληλεπίδραση του pH σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ήταν στατιστικώς σημαντική. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι οι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης του επιπέδου pH 6 ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικοί σε σχέση με τα επίπεδα pH 7 και pH 8, τα οποία όμως δεν διέφεραν μεταξύ τους (Πίνακας 2.17).

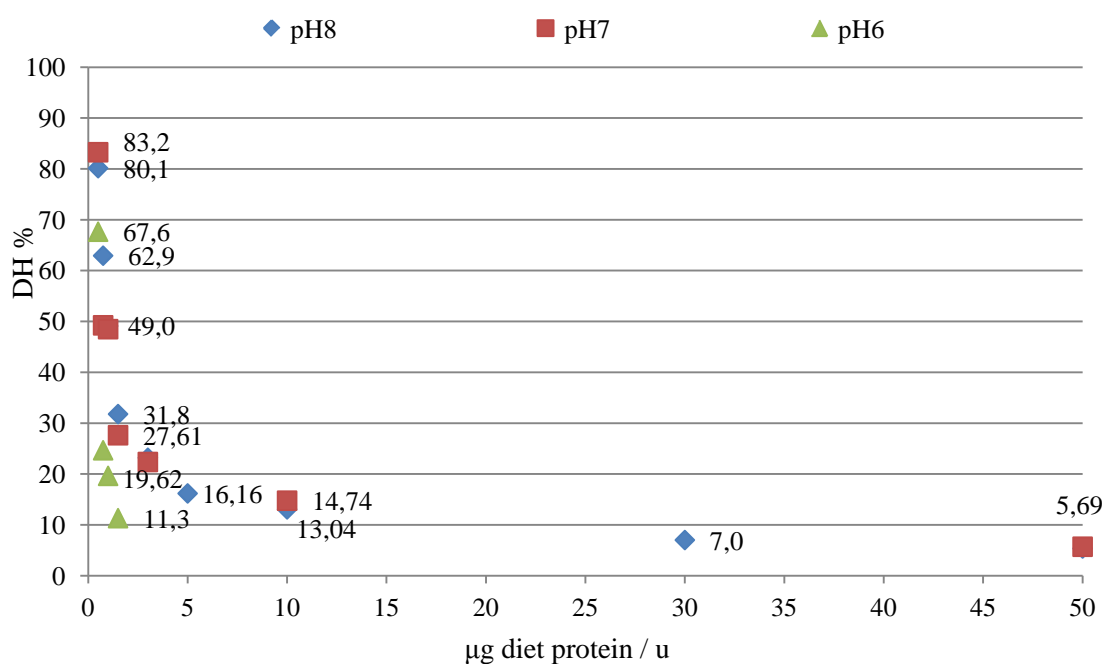
Πίνακας 2.11.: Ανάλυση διακύμανσης με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %

Πηγή παραλλακτικότητας	Επίπεδο pH	Αναλογία σιτηρεσίου / u ενζυμικής δραστηριότητας	pH * Αναλογία σιτηρεσίου/ u ενζυμικής δραστηριότητας
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές	*	*	*

Πίνακας 2.12.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K= Σειρά με την οποία τα επίπεδα pH έδωσαν καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης

Επίπεδο pH	pH 8	pH 7	K
pH 8			1
pH 7	-		2
pH 6	***	***	3



Εικόνα 2.8.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στα διάφορα επίπεδα pH σε σχέση με την αναλογία συγκέντρωσης του σιτηρεσίου / U αλκαλικών πρωτεασών (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 3: επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Η ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες που εφαρμόστηκε για την εξέταση της επίδρασης του παράγοντα της θερμοκρασίας δεν ανέδειξε στατιστικές σημαντικές διαφορές, όπως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική και η αλληλοεπίδραση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου με τη θερμοκρασία (Εικόνα 2.9., Πίνακας 2.13.). Αντίθετα η συγκέντρωση του σιτηρεσίου είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση, όπως έχει αναλυθεί στο πείραμα 1. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD, για την σύγκριση των διαφόρων ζευγών θερμοκρασίας, ο μόνος συνδυασμός ο οποίος ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικός σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 % ήταν αυτός της θερμοκρασίας 25 °C με τη θερμοκρασία 15 °C (Πίνακας 2.14.).

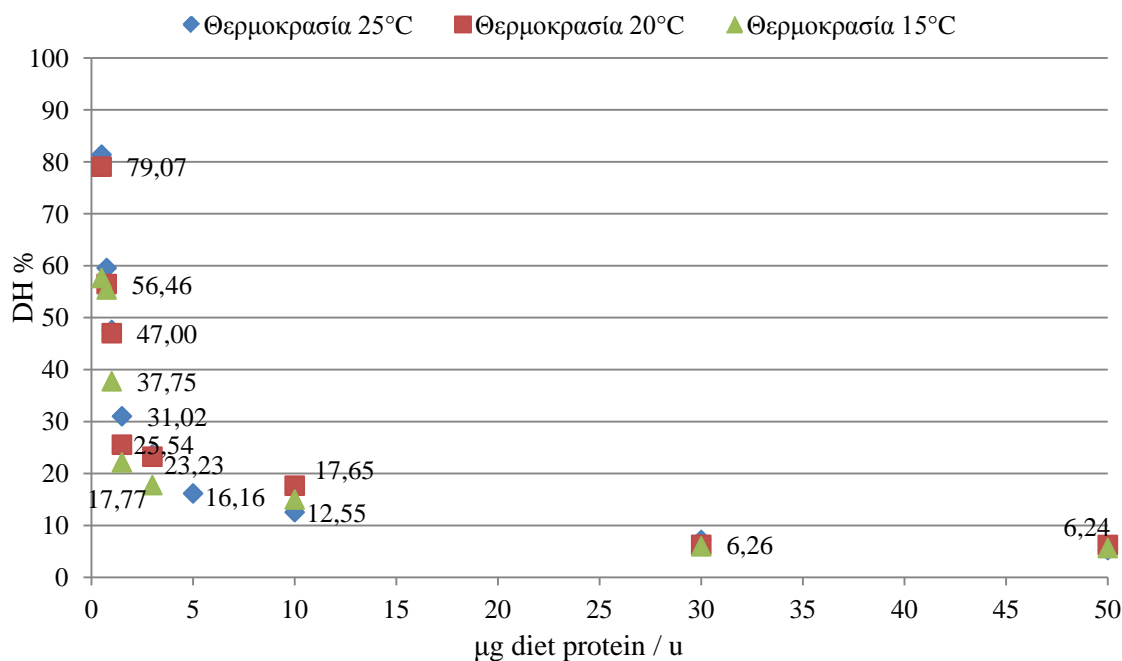
Πίνακας 2.13.: Ανάλυση διασποράς με δυο παράγοντες σε επίπεδο σημαντικότητας 95 %

Πηγή παραλλακτικότητας	Θερμοκρασία	Αναλογία σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας	Θερμοκρασία * Αναλογία σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές	-	*	-

Πίνακας 2.14.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K = Σειρά με την οποία οι θερμοκρασίες έδωσαν καλύτερους βαθμούς αυτοϋδρόλυσεων

Θερμοκρασία	25 °C	20 °C	K
25 °C			1
20 °C	-		2
15 °C	*	-	3



Εικόνα 2.9.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στις διάφορες θερμοκρασίες σε σχέση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 4: επίδραση της αλατότητας στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Η ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες ανέδειξε στατιστικώς σημαντική επίδραση του ποσοστού της αλατότητας (Πίνακας 2.15.). Επιπλέον, ήταν στατιστικώς σημαντική η αλληλοεπίδραση του με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου, η οποία με τη σειρά της

παρουσίασε επίσης στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD, για τη σύγκριση των διάφορων ζευγών αλατότητας (Πίνακας 2.16.), απεδείχθη ότι ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης σε αλατότητα 35 ‰ ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικός σε σχέση με αυτόν σε αλατότητες 0 ‰ και 15 ‰ σε διάστημα εμπιστοσύνης 95 %.

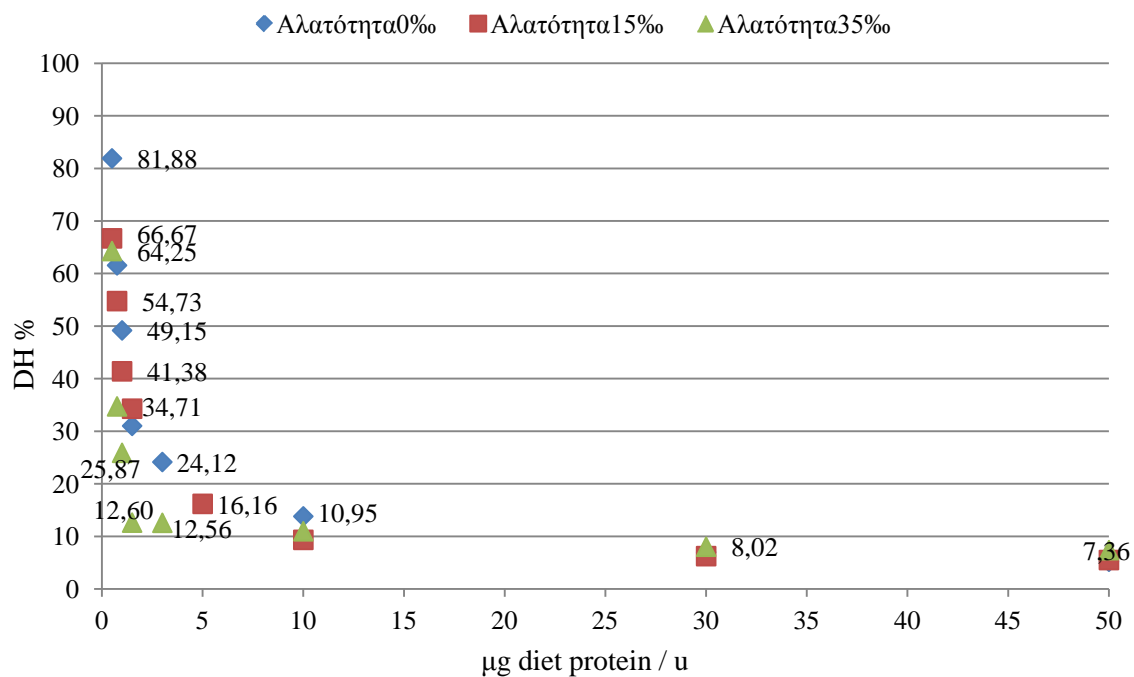
Πίνακας 2.15.: Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Πηγή παραλλακτικότητας	Αλατότητα	Αναλογία σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας	Αλατότητα * Αναλογία σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας
Στατιστικώς σημαντικές διαφορές	*	*	*

Πίνακας 2.16.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

K = Σειρά με την οποία τα ποσοστά αλατότητας έδωσαν καλύτερους βαθμούς ενζυμικών υδρολύσεων

Αλατότητα	0 ‰	15 ‰	K
0 ‰			1
15 ‰	-		2
35 ‰	***	*	3



Εικόνα 2.10.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στα διάφορα ποσοστά αλατότητας σε σχέση με την συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

2.4.2. Ανάπτυξη εξίσωσης

2.4.2.1. Βαθμός Αυτοϋδρόλυσης

Παράμετρος 1: επίδραση της συγκέντρωσης σιτηρεσίου CB (ως υπόστρωμα) στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Τα πειραματικά δεδομένα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου στο εξεταζόμενο μείγμα για την επίτευξη καλύτερης τιμής ελέγχου (*p value*) της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων. Στη συνέχεια εξετάστηκαν διάφορες εξισώσεις οι οποίες θα μπορούσαν να περιγράψουν και να προβλέψουν τους βαθμούς αυτοϋδρόλυσεων των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων, με εξέταση επαλήθευσης όπου συγκρίθηκαν τα πειραματικά δεδομένα με τα προβλεπόμενα της εξίσωσης. Η εξίσωση που τελικά επιλέχθηκε ήταν η εκθετική αποσύνθεση διπλής φάσης (Two phase exponential decay), η οποία χρησιμοποιήθηκε κατόπιν στην ανάπτυξη:

$$Y = \text{Span1} * \exp(-K1 * X) + \text{Span2} * \exp(-K2 * X) + \text{Plateau}$$

Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Με την εκάστοτε αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου μειωνόταν ο βαθμός αυτοϋδρόλυσης. Επίσης ο ρυθμός της μείωσης μειωνόταν, έως την συγκέντρωση 10 μg διατροφικής πρωτεΐνης. Από αυτό το επίπεδο και πάνω δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε όλα τα πειραματικά δεδομένα των διαφόρων υπό μελέτη παραγόντων όπως θερμοκρασία, αλατότητα, επιπέδου pH. Έγινε επιλογή των καλύτερων σταθερών τιμών που καθιστούν την εξίσωση ικανή να χρησιμοποιήσει τα πειραματικά δεδομένα χωρίς στατιστικές απώλειες. Έτσι διαμορφώθηκαν οι σταθερές τιμές και τα διάφορα μαθηματικά κριτήρια ως εξής:

$$\text{Span1} = 21,85$$

$$\text{Span2} = 131,8$$

$$\text{Plateau} = 4,597$$

$$-K1 = -0,2338$$

$$-K2 = -3,475$$

Y = Ο προβλεπόμενος βαθμός αυτοϋδρόλυσης.

X = Η συγκέντρωση του σιτηρεσίου.

Έτσι, η εξίσωση (Εικόνα 2.3) διαμορφώνεται ως εξής:

$$Y = f(x) = 21,85 e^{-0,2338 * X} + 131,8 e^{-3,475 * X} + 4,597$$

Η τιμή ελέγχου (*P value*) της εξέτασης επαλήθευσης της εξίσωσης ήταν 0,0823, η οποία υποδηλώνει ότι η εξέταση επαλήθευσης της εξίσωσης είναι επιτυχής και δεν υπάρχουν

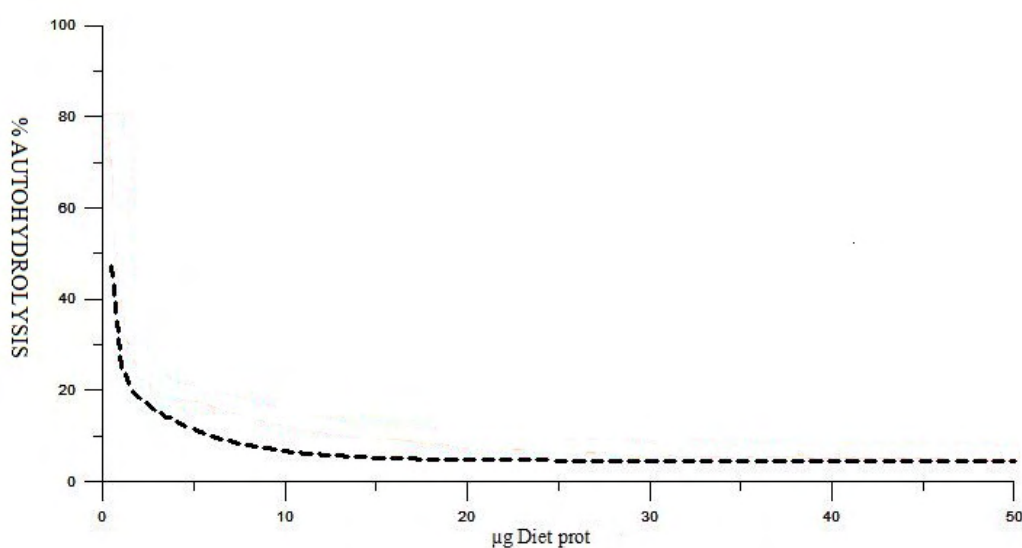
στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών και υπολογιζόμενων δεδομένων ($P > 0,05$).

Τα πειραματικά δεδομένα αυτοϋδρόλυσης δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή (D'Agostino-Pearson test, $P < 0,0001$)

Ο συντελεστής συσχέτισης της αναπτυσσόμενης εξίσωσης ήταν $r^2 = 0,6289$. Το μεγάλο πλήθος και το μεγάλο εύρος των πειραματικών δεδομένων διαμόρφωσαν ένα μικρό συντελεστή συσχέτισης.

Τυπικό σφάλμα = 10,76

Εξεταζόμενα σημεία = 387



Εικόνα 2.11.: Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης πρώτης τάξης του βαθμού αυτοϋδρόλυσης του σιτηρεσίου CB σε διαφορετικές συνθήκες με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 2: επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό αυτοϋδρολύσεως των διατροφικών πρωτεϊνών

Ύστερα από την προσαρμογή της εξίσωσης με επιτυχία στην πρόβλεψη των βαθμών αυτοϋδρολύσεων σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου, έγινε επιπλέον ταξινόμηση των πειραματικών τιμών σε τρεις ομάδες που αντιστοιχούσαν στο επίπεδο pH και προστέθηκε στην εξίσωση πρώτης τάξης η μεταβλητή παράμετρος NpH . Η τιμή συσχέτισης των τιμών της μεταβλητής παράμετρος NpH ήταν 1 με χρήση του τύπου $\log(\text{agonist})$ vs. response , ο οποίος επιλέχθηκε από το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 και συνδυάζει τις τρεις τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NpH , η οποία περιγράφεται ως εξής:

$$NpH = \text{κατώτερη τιμή} + (\text{ανώτερη τιμή} - \text{κατώτερη τιμή}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - pH))})$$

Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Κατά την προσαρμογή της εξίσωσης στα τρία αυτά επίπεδα pH, προέκυψαν οι μεταβλητές τιμές της παραμέτρου NpH (Πίνακας 2.12.). Οι μεταβλητές τιμές (NpH) των διαφόρων επιπέδων pH, αυξάνονταν με την αύξηση των βαθμών αυτοϋδρολύσεων. Οι συντελεστές συσχέτισεων ήταν μεγαλύτεροι στο επίπεδο pH 8 από ότι στο pH 6 και pH 7 αντίστοιχα σύμφωνα με την εξίσωση δεύτερης τάξης. Αυτός ο τύπος χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα κάθε φορά που χρειάστηκε, για το συνδυασμό των διαφόρων μεταβλητών παραμέτρων, μόνο όταν υπήρχε θετική μεταβολή των μεταβλητών τιμών των παραμέτρων με την αύξηση των βαθμών αυτοϋδρολύσεων.

Εξετάστηκαν διάφορα μαθηματικά κριτήρια. Τα τυπικά σφάλματα διέφεραν και στις τρεις καμπύλες της αναπτυσσόμενης εξίσωσης, επειδή επηρεάστηκαν από τις διαφορές μεταξύ των αριθμών N των εξεταζόμενων σημείων. Κατά την διενέργεια εξέτασης επαλήθευσης της εξίσωσης, υπήρξαν διαφορές, πράγμα το οποίο οφείλεται στο μεγάλο όγκο και εύρος των πειραματικών δεδομένων της κάθε καμπύλης. Οι εξετάσεις ομαλότητας και φυσικής κατανομής των βαθμών αυτοϋδρολύσεων των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου στα τρία επίπεδα pH βάση της αναπτυσσόμενης εξίσωσης, με την μέθοδο D'Agostino-Pearson, απέδειξαν ότι μόνο οι βαθμοί αυτοϋδρολύσεων του pH6 διανέμονται φυσικά, δηλαδή ακολουθούν την πληθυσμιακή κατανομή Gaussian. Η αναπτυσσόμενη εξίσωση έχει τη δυνατότητα πρόβλεψης των βαθμών αυτοϋδρολύσεων όλων των συγκεντρώσεων συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου pH 6.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μια μικρή τιμή ελέγχου (P value) της εξέτασης της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων, βάση της αναπτυσσόμενης εξίσωσης, υποδηλώνει ότι τα πειραματικά δεδομένα δεν κατανέμονται φυσικά. Ο D'Agostino για την εξέταση της φυσικής κατανομής εφηύρε διαφορετικούς τρόπους εξέτασεων της φυσικής κατανομής δεδομένων. Αυτή η οποία χρησιμοποιείται σε αυτήν την μελέτη είναι η εξέταση

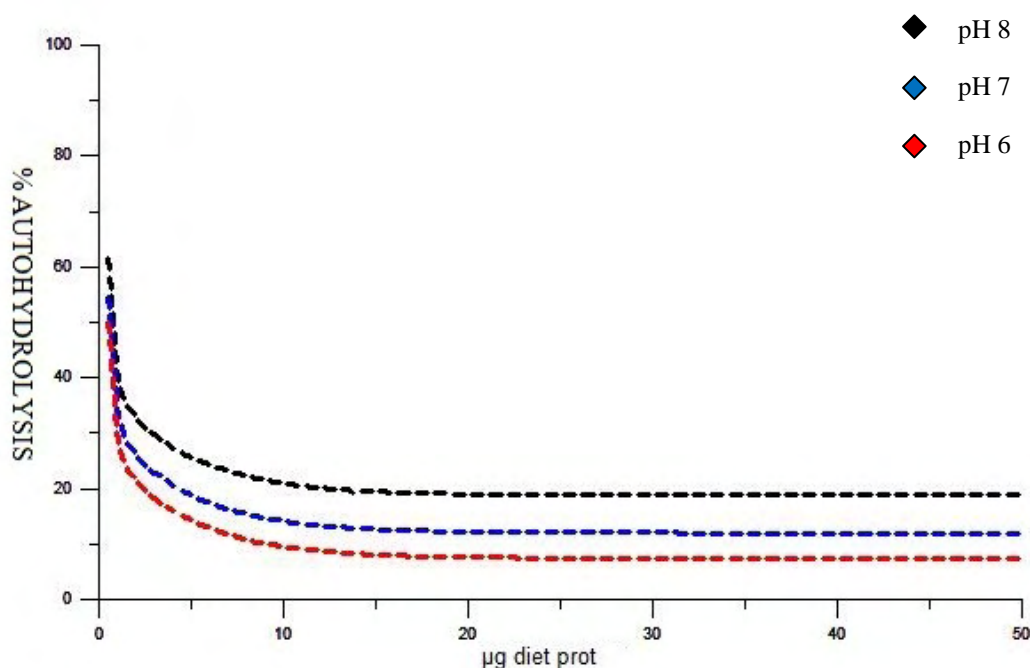
omnibus K2 η οποία είναι ευέλικτη και αποτελεσματική σε σύγκριση με άλλες εξετάσεις φυσικής κατανομής δεδομένων.

Η εξίσωση δεύτερης τάξης (Εικόνα 2.12.) διαμορφώνεται ως εξής:

$$Y = f(x) + f(pH) = (21,85 e^{(-0,2338 \cdot X)} + 131,8 e^{(-3,475 \cdot X)} + 4,597) + (1,975 + (12,24 + 1,975)/(1 + 10^{(7,208 - pH)}))$$

Πίνακας 2.17.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης δεύτερης τάξης

Επιπέδο pH	Τιμές (NpH)	r ²	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x•	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
pH6	2,574	0,6523	36	6,233	0,0252	0,8033
pH7	5,901	0,4544	153	13,52	0,0058	< 0,0001
pH8	10,81	0,6640	198	10,34	< 0,0001	< 0,0001
Τιμές (NpH)	Τέλειος συνδυασμός	1,000	3	0	-	-



Εικόνα 2.12.: Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης δεύτερης τάξης του βαθμού αυτοϋδρόλυσης του σιτηρεσίου CB σε διάφορα επίπεδα pH με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 3: επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Σε αυτό το στάδιο τα πειραματικά δεδομένα ταξινομήθηκαν σε κατηγορίες ανάλογα με το επίπεδο pH, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου, προκειμένου να προστεθεί στην εξίσωση η μεταβλητή παράμετρος NT, η οποία σχετίζεται με την εκάστοτε αλλαγή της θερμοκρασίας.

Η νέα παράμετρος ενσωματώθηκε στην προηγούμενη αναπτυσσόμενη εξίσωση με πρόσθεση.

Πίνακας 2.18.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης τρίτης τάξης. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις της εξίσωσης

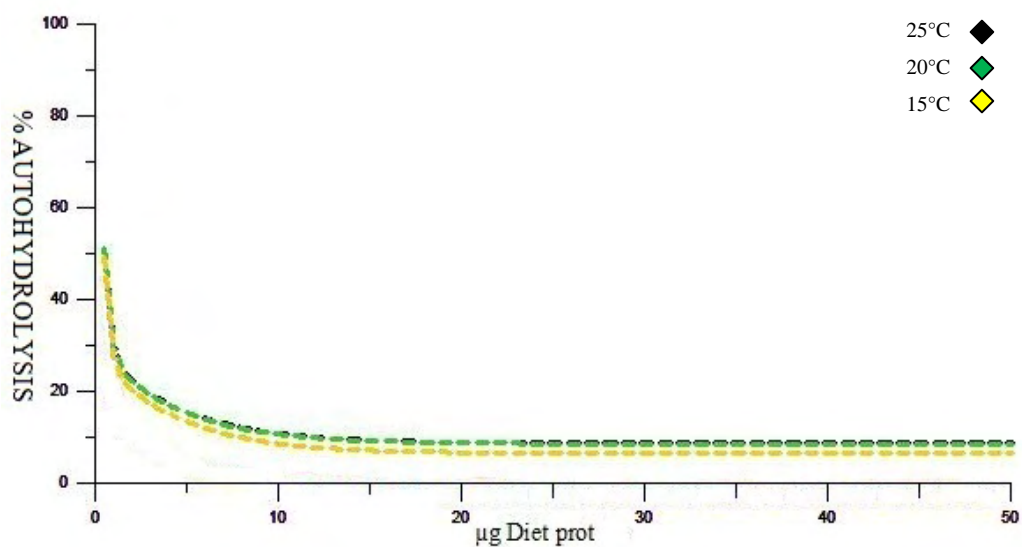
Θερμοκρασία	Τιμές (NT)	pH	r^2	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x•	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
25°C	-8,155	pH6	0,6990	12	6,870	0,0120	0,3174
		pH7	0,7788	72	8,791	< 0,0001	0,0017
		pH8	0,7563	78	8,434	0,6840*	0,0002
20°C	-8,302	pH6	0,8613	12	3,715	0,9192*	0,4431
		pH7	0,2933	63	17,60	0,9838*	0,0894
		pH8	0,7823	75	8,928	0,0134	< 0,0001
15°C	-10,35	pH6	0,7387	12	6,657	0,0710*	0,6535
		pH7	0,8036	45	5,535	0,3811*	0,0003
		pH8	0,8486	45	6,467	0,0009	0,0188
Τιμές (NT)	Τέλειος συνδυασμός		1,000	3	0	-	-

Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Κατά την προσαρμογή της εξίσωσης, ώστε να συμπεριλαμβάνει την θερμοκρασία του μείγματος, προέκυψαν οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NT, οι οποίες αυξάνονταν με την αύξηση της θερμοκρασίας με παράλληλη αύξηση των βαθμών αυτοϋδρόλυσεων. Η τιμή της συσχέτισης των μεταβλητών τιμών NpH ήταν 1, σύμφωνα με τον τύπο $\log(\text{inhibitor})$ vs. response και έχει περιγραφεί στο πείραμα 1. Στις εξετάσεις ομαλότητας και φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων σε σχέση με την αναπτυσσόμενη εξίσωση, με την μέθοδο D'Agostino-Pearson, αποδείχθηκε ότι οι βαθμοί αυτοϋδρόλυσεων γενικά κατανέμονται φυσικά και ακολουθούν την πληθυσμιακή κατανομή Gaussian (Πίνακας 2.18.).

Έτσι, η εξίσωση τρίτης τάξης (Εικόνα 2.13.) διαμορφώθηκε ως εξής:

$$Y = f(x) + f(pH) + f(T^{\circ}C) = (21,85 e^{(-0,2338 * X)} + 131,8 e^{(-3,475 * X)} + 4,597) + (1,975 + (12,24 + 1,975) / (1 + 10^{(7,208 - pH)})) + (-10,35 + (-8,155 + 10,35) / (1 + 10^{(18,86 - T^{\circ}C)}))$$



Εικόνα 2.13.: Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης τρίτης τάξης του βαθμού αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στις διάφορες θερμοκρασίες με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου όταν το pH = 8 (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 4: επίδραση της αλατότητας στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Τέλος, οι βαθμοί αυτοϋδρόλυσεων ταξινομήθηκαν βάση της συγκέντρωσης σιτηρεσίου, του επιπέδου pH, του ποσοστού της αλατότητας και της θερμοκρασίας. Σε αυτό το στάδιο προστέθηκε στην αναπτυσσόμενη εξίσωση η μεταβλητή παράμετρος της αλατότητας NS.

Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Βάση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου NS, με την αύξηση της αλατότητας μειώνονταν ο βαθμός αυτοϋδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών (Εικόνα 2.14.) του σιτηρεσίου, ενώ παράλληλα οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NS μειώνονταν με την αύξηση της αλατότητας.

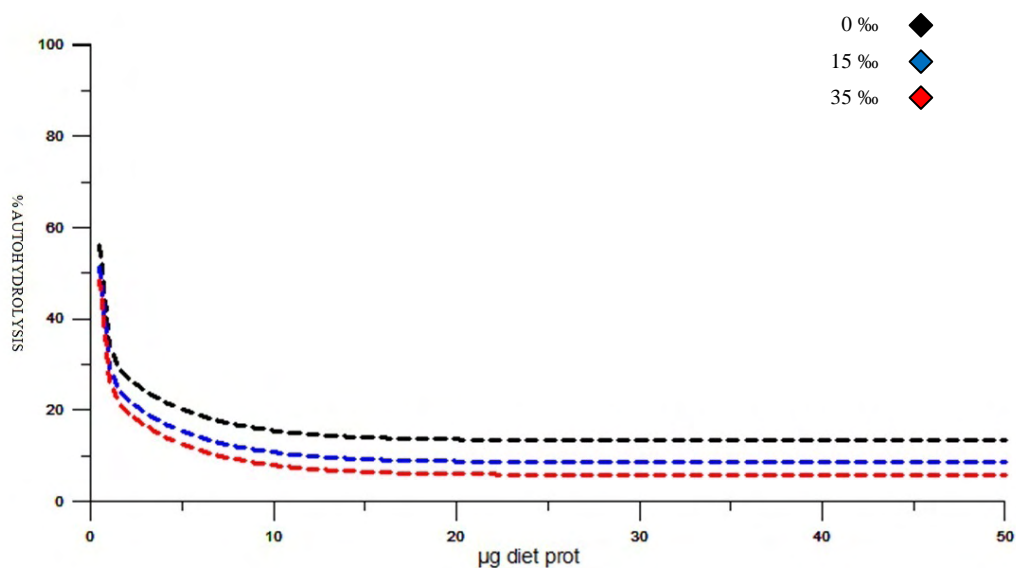
Με την ολοκλήρωση της προσαρμογής, συμπεριλαμβανομένων των τεσσάρων μεταβλητών παραμέτρων (Πίνακας 2.19.), οι τιμές των τελικών συντελεστών συσχετίσεων της κάθε καμπύλης ήταν ικανοποιητικές, με εξαίρεση την καμπύλη pH 6 σε θερμοκρασία 15 °C, αλατότητα 0 ‰, την καμπύλη pH 7 σε θερμοκρασία 20 °C, αλατότητα 15 ‰ και την καμπύλη pH 7 σε θερμοκρασία 20 °C αλατότητα 35 ‰, των οποίων τα πειραματικά δεδομένα τους παρουσίασαν ανωμαλίες ως προς την αναπτυσσόμενη εξίσωση (Πίνακας 2.19.). Οι επιτυχείς τιμές για την εξέταση επαλήθευσης της εξίσωσης μειώθηκαν, επειδή επηρεάστηκαν από την τελευταία προστιθέμενη εξίσωση στην αναπτυσσόμενη εξίσωση. Τα αποτελέσματα της εξέτασης της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων βελτιώθηκαν υποδηλώνοντας τη φυσική κατανομή των διαφόρων πειραματικών δεδομένων. Ο συνδυασμός των μεταβλητών τιμών αλατότητας NS χρησιμοποιώντας την προστιθέμενη εξίσωση επετεύχθη χωρίς κανένα σφάλμα.

Έτσι, η τελική εξίσωση (Εικόνα 2.10) διαμορφώθηκε ως εξής:

$$Y = f(x) + f(\text{pH}) + f(T^{\circ}\text{C}) + f(S\text{‰})$$
$$= (21,85 e^{(-0,2338 * X)} + 131,8 e^{(-3,475 * X)} + 4,597) + (1,975 + (12,24 + 1,975) / (1 + 10^{((7,208 - \text{pH}))})) + (-10,35 + (-8,155 + 10,35) / (1 + 10^{(18,86 - T^{\circ}\text{C})})) + (-4,850 + (2,756 + 4,850) / (1 + 10^{(S\text{‰} - 14,77)})).$$

Πίνακας 2.19.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης τέταρτης τάξης σύμφωνα με την τελευταία προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων αυτοϋδρολύσεων. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις της εξίσωσης

Αλατότητα	Τιμές (NS)	pH	Θερμοκρασία	r^2	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x•	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
0 ‰	2,756	pH8	15 °C	0,8552	27	6,356	0,1096*	0,0082
			20 °C	0,8129	27	9,782	< 0,0001	0,0004
			25 °C	0,8202	27	8,077	0,0003	0,1029
		pH7	15 °C	0,9647	27	2,643	0,6720*	0,0017
			20 °C	0,5986	27	17,62	< 0,0001	0,0825
			25 °C	0,7784	27	9,403	0,0002	0,0754
		pH6	15 °C	-0,3869	12	8,146	0,0161	0,6535
			20 °C	0,8219	12	4,210	0,5310*	0,4431
			25 °C	0,4569	12	9,228	0,0012	0,3174
15 ‰	-2,033	pH8	15 °C	0,7365	18	7,892	0,0051	0,3106
			20 °C	0,8548	27	4,666	0,0162	0,3990
			25 °C	0,6988	27	6,193	0,0005	0,0431
		pH7	15 °C	0,5446	18	6,496	0,0046	0,4923
			20 °C	-3,232	18	12,79	< 0,0001	0,1890
			25 °C	0,9132	18	4,741	0,0007	0,2236
35 ‰	-4,850	pH8	25 °C	0,7205	24	10,26	0,0112	0,0003
			20 °C	0,6767	21	11,78	0,1585*	0,0012
		pH7	20 °C	-6,382	18	14,75	< 0,0001	0,1801
Τιμές (NS)	Τέλειος συνδυασμός	-	-	1	3	0	-	-



Εικόνα 2.14.: Μη γραμμική συσχέτιση της εξίσωσης τέταρτης τάξης των βαθμών αυτοϋδρολύσεων των διατροφικών πρωτεϊνών στα διάφορα ποσοστά αλατότητας με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου όταν το pH = 8 και η θερμοκρασία = 25 °C (από 387 εξεταζόμενα σημεία).

Πίνακας 2.20.: Ποιοί από τους διάφορους παράγοντες επηρεάζουν το βαθμό αυτοϋδρόλυσης περισσότερο ($\Delta f(x)$, $\Delta f(pH)$, $\Delta f(T^{\circ}C)$, $\Delta f(S\%)$)

Μεταβλητή παράμετρος	Διαφορά μεταβλητών τιμών	Σειρά με την οποία οι παράγοντες επηρεάζουν το βαθμό αυτοϋδρόλυσης
Συγκέντρωση σιτηρεσίου	42,63	1
NpH	8,24	2
NT	2,19	4
NS	7,61	3

2.4.2.2. Βαθμός Ενζυμικής Υδρόλυσης

Παράμετρος 1: επίδραση της αναλογίας συγκέντρωσης σιτηρεσίου CB (ως υπόστρωμα) ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Για την καλύτερη απεικόνιση των δεδομένων αυτού του πειράματος επιλέχθηκε η εξίσωση εκθετικής αποσύνθεσης διπλής φάσης (Two phase exponential decay) έπειτα από σύγκριση με άλλες εξισώσεις με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 5. Αναλυτικότερα συγκρίθηκε με εξισώσεις μιας φάσης, όπως One phase exponential decay, οι οποίες έδωσαν σχετικά μικρό συντελεστή συσχέτισης και μικρή τιμή ελέγχου (*p Value*) κατά την εξέταση επαλήθευσης της εξίσωσης. Αποδείχθηκε δύσκολο να προβλεφθούν οι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης με εξισώσεις μιας φάσης, αφού οι καμπύλες ενζυμικής υδρόλυσης δείχνουν μία φάση στις μεγάλες συγκεντρώσεις σιτηρεσίων με αργό ρυθμό αύξησης του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης και άλλη στις μικρές συγκεντρώσεις σιτηρεσίων με ταχύ ρυθμό αύξησης του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση εκθετικής αποσύνθεσης διπλής φάσης (Two phase exponential decay) όπως και για την περιγραφή του βαθμού αυτοϋδρόλυσης:

$$Y = \text{Span1} * \exp(-K1 * X) + \text{Span2} * \exp(-K2 * X) + \text{Plateau}$$

Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Με την αύξηση της αναλογίας συγκέντρωσης σιτηρεσίου / U δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών μειωνόταν ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10 μg διατροφικής πρωτεΐνης / U δραστηριότητας δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές και ο ρυθμός μείωσης παρέμεινε σταθερός. Έχοντας υπόψη αυτό αναπτύχθηκε η εξίσωση με δύο ρυθμούς αυξήσεων του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης. Επιλέχθηκαν οι καλύτερες σταθερές τιμές, οι οποίες καθιστούν την εξίσωση ικανή να χρησιμοποιήσει τα πειραματικά δεδομένα χωρίς στατιστικές απώλειες. Έτσι οι τιμές της εξίσωσης διαμορφώθηκαν ως εξής:

$$\text{Span1} = 21,21$$

$$\text{Span2} = 141,2$$

$$\text{Plateau} = 5,428$$

$$K1 = 0,09631$$

$$K2 = 1,919$$

$Y = 0$ προβλεπόμενος βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης.

$X = H$ αναλογία συγκέντρωσης του σιτηρεσίου / U ολικών αλκαλικών πρωτεασών.

\exp Αποδίδει τη σταθερά e υψωμένη σε δύναμη

0,8527 = Τιμή ελέγχου (*P value*) της επαλήθευσης της εξίσωσης

0,0001 > της τιμής ελέγχου (*P value*) για την εξέταση της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων ενζυμικής υδρόλυσης (D'Agostino-Pearson test)

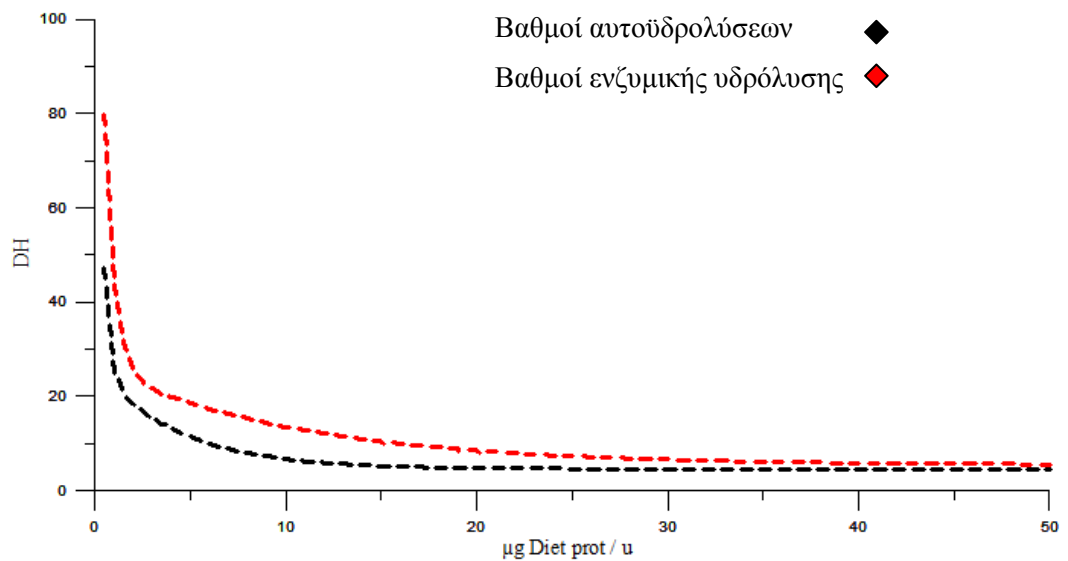
Συντελεστής συσχέτισης (r^2) = 0,7639

13,99 = Τυπικό σφάλμα

302 = Εξεταζόμενα σημεία

Έτσι, η εξίσωση πρώτης τάξης (Εικόνα 2.15.) διαμορφώνεται ως εξής:

$$Y = f(x) = (21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428)$$



Εικόνα 2.15.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης πρώτης τάξης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 2: επίδραση του pH στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Ύστερα από την προσαρμογή της εξίσωσης με επιτυχία για την πρόβλεψη των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης σε σχέση με την αναλογία συγκέντρωσης των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας, αναπτύχθηκε η ίδια εξίσωση με σκοπό να συμπεριλάβει τον παράγοντα του επιπέδου pH. Τα πειραματικά δεδομένα ταξινομήθηκαν σε τρεις επιπλέον κατηγορίες ανάλογα με το επίπεδο pH. Έγινε προσθήκη της μεταβλητής παραμέτρου NpH, η οποία μεταβάλλεται με την μεταβολή του επιπέδου pH.

log(agonist) vs. response (three parameters): $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X)))}$

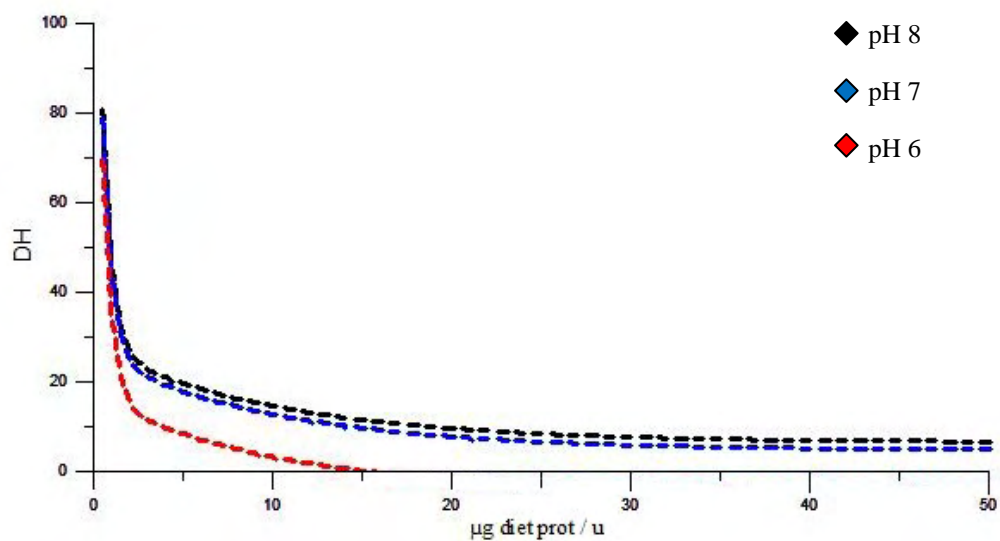
Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Για την εκτίμηση της ποιότητας της εξίσωσης, προσδιορίστηκαν οι τιμές συσχετίσεων των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης με την αναλογία συγκέντρωσης των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών, οι οποίες ήταν μεγάλες στο επίπεδο pH 7, pH 6, pH 8 αντίστοιχα (Πίνακας 2.21.). Στην εξέταση επαλήθευσης, η τιμή ελέγχου (*p value*) ήταν πάνω από 0,05 στο pH8. Τα δεδομένα στο επίπεδο pH 6 και pH 7 ακολουθούσαν φυσική κατανομή. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NpH αυξάνονταν με την αύξηση του επιπέδου pH, ειδικά μεταξύ του επιπέδου pH 6 και pH 7. Η πρόβλεψη των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης ήταν εφικτή σε επίπεδο pH 6 σε σχέση με όλες τις αναλογίες συγκέντρωσης σιτηρεσίου / U δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών, αλλά δεν ήταν δυνατή η εργαστηριακή μέτρησή τους (Εικόνα 2.16.). Η εξίσωση Δεύτερης τάξης (Εικόνα 2.13, Πίνακας 2.15) διαμορφώθηκε ως εξής:

$$Y = f(x) + f(\text{pH}) = (21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428) + (-23,10 + (1,296 + 23,10) / (1 + 10^{(5,955 - \text{pH})}))$$

Πίνακας 2.21.: Χαρακτηριστικά της εξίσωσης δεύτερης τάξης. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις

Επίπεδο pH	Τιμές (NpH)	r ²	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x•	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
pH 6	-23,07	0,8094	12	10,28	0,0295	0,8128
pH 7	-0,7197	0,9535	45	5,456	0,0152	0,4736
pH 8	1,078	0,7814	245	13,61	0,8751*	< 0,0001
Τιμές (NpH)	Τέλειος συνδυασμός	1,000	3	0	-	-



Εικόνα 2.16.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης δεύτερης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στα διάφορα επίπεδα pH με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 3: επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Συνεχίζοντας την ανάπτυξη της εξίσωσης για να συμπεριλάβει τον παράγοντα της θερμοκρασίας, τα πειραματικά δεδομένα ταξινομήθηκαν σε κατηγορίες ανάλογα με το επίπεδο του pH και τη θερμοκρασία. Διαμορφώθηκε η μεταβλητή παραμέτρου NT, η οποία μεταβάλλεται με την μεταβολή της θερμοκρασίας.

log(agonist) vs. response (Με τρεις παραμέτρους): $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X))})$

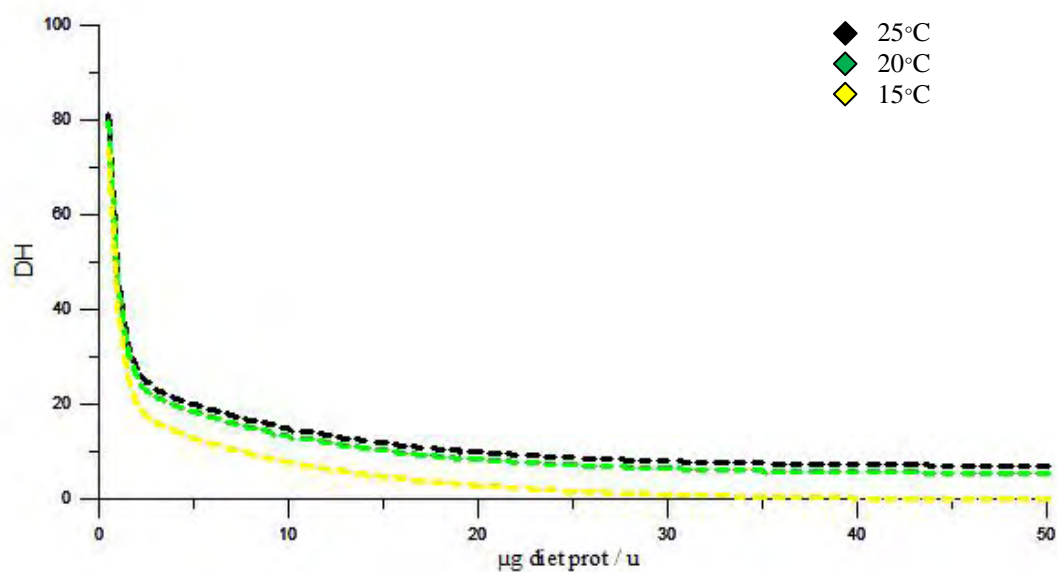
Χαρακτηρίστηκα εξίσωσης

Για την εκτίμηση της ποιότητας της αναπτυσσόμενης εξίσωσης, προσδιορίστηκαν οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης, ο οποίος ήταν μεγαλύτερος στο επίπεδο pH 8 σε θερμοκρασία 20 °C (Πίνακας 2.22.). Όλες οι τιμές συσχετίσεων κρίθηκαν ικανοποιητικές. Στην εξέταση επαλήθευσης οι τιμές ελέγχου (*p value*) ήταν ικανοποιητικές (Πίνακας 2.22.). Στην εξέταση της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων τα πειραματικά δεδομένα της καμπύλης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης στο επίπεδο pH 6 και pH 8, σε θερμοκρασία 25°C και 20 °C αντίστοιχα ακολουθούσαν φυσική κατανομή σε αντίθεση με τα δεδομένα στο επίπεδο pH 8 σε θερμοκρασία 25 °C. Στην εξέταση επαλήθευσης η καμπύλη του επιπέδου pH 8 σε θερμοκρασία 25 °C είχε τα πιο θετικά αποτελέσματα. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NT αυξάνονταν με την αύξηση της θερμοκρασίας, ειδικά στα σημεία 15 °C και 20 °C (Πίνακας 2.22.). Έτσι, η εξίσωση τρίτης τάξης (Εικόνα 2.17.) διαμορφώθηκε ως εξής:

$$Y = f(x) + f(pH) + f(T^{\circ}C) = (21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428) + (-23,10 + (1,296 + 23,10) / (1 + 10^{(5,955 - pH)})) + (-6,783 + (0,2908 + 6,783) / (1 + 10^{(19,45 - T^{\circ}C)}))$$

Πίνακας 2.22.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης τρίτης τάξης. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις

Θερμοκρασία	Τιμές (NT)	pH	r ²	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x•	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
25 °C	0,2908	pH6	0,8092	12	9,845	0,0509*	0,8128
		pH7	0,9533	21	5,332	0,0232*	0,4736
		pH8	0,7700	221	14,50	0,7840*	< 0,0001
20 °C	-1,269	pH8	0,9635	24	4,680	0,3639*	0,5756
15 °C	-6,783	pH8	0,8461	24	7,695	< 0,0001	0,0130
Τιμές (NT)	Τέλειος συνδυασμός	-	1,000	3	0	-	-



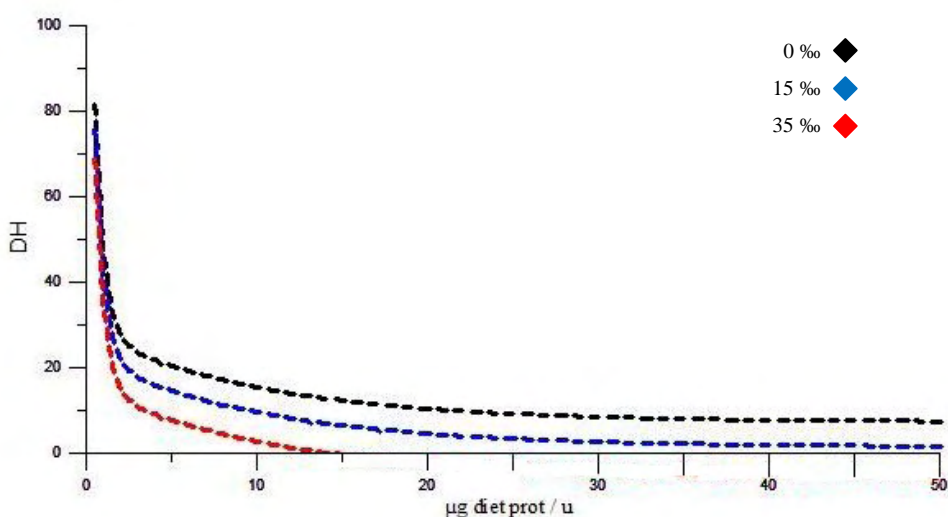
Εικόνα 2.17.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης τρίτης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στις διάφορες θερμοκρασίες με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Παράμετρος 4: επίδραση της αλατότητας στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Σε αυτήν την προσαρμογή της εξίσωσης για την πρόβλεψη των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στους διάφορους περιβαλλοντολογικούς και βιολογικούς παράγοντες, των οποίων εξετάζεται η επίδραση τους στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro*, έγινε υπόθεση της μεταβλητής παραμέτρου NS, η οποία μεταβάλλεται με την εκάστοτε μεταβολή της αλατότητας. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετική εξίσωση για τη σύνδεση των τιμών της παραμέτρου NS, η οποία λειτουργεί ως αντίθετο της εξίσωσης η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη σύνδεση των προηγούμενων παραμέτρων, ως εξής:

$$\log(\text{inhibitor}) \text{ vs. response: } Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((X - \text{LogEC50}))})$$

Χαρακτηριστικά εξίσωσης



Εικόνα 2.18.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης τέταρτης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στα διάφορα ποσοστά αλατότητας με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου όταν pH=8 και θερμοκρασία = 25 °C (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Οι υψηλές τιμές συσχετίσεων αποδεικνύουν ότι τα πειραματικά δεδομένα διανέμονται ακριβώς γύρω από την αναπτυσσόμενη εξίσωση. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NS συνδυάστηκαν με άριστο τρόπο αναπτύσσοντας την εξίσωση στην τέταρτη τάξη (Πίνακας 2.23.). Διακρίνεται η καμπύλη των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης σε επίπεδο pH 8 και θερμοκρασία 20 °C, της οποίας τα πειραματικά δεδομένα κατανέμονται φυσικά και δεν απέχουν πολύ από την αναπτυσσόμενη εξίσωση. Οι τιμές της παραμέτρου NS μειώνονταν με την αύξηση της αλατότητας, επίσης ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης μειώνονταν με τη

μείωση της παραμέτρου NS (Εικόνα 2.23.). Έτσι, η εξίσωση τέταρτης τάξης (Εικόνα 2.18.) διαμορφώθηκε ως εξής:

$$Y = f(x) + f(pH) + f(T^{\circ}C) + f(S\%) = (21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428) + (-23,10 + (1,296 + 23,10)/(1 + 10^{(5,955 - pH)})) + (-6,783 + (0,2908 + 6,783)/(1 + 10^{(19,45 - T^{\circ}C)})) + (-12,20 + (0,5186 + 12,20)/(1 + 10^{(S\% - 15,07)}))$$

Πίνακας 2.23.: Τα χαρακτηριστικά των εξισώσεων τέταρτης τάξης. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις

Αλατότητα	Τιμές (NS)	pH	Θερμο- κρασία	r ²	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino- Pearson
0 ‰	0,5186	pH 6	25 °C	0,8081	12	9,874	0,0498	0,8128
		pH 7	25 °C	0,9524	21	5,386	0,0206	0,4736
		pH 8	25 °C	0,7804	173	14,96	0,0084	< 0,0001
			20 °C	0,9630	24	4,709	0,3443*	0,5756
			15 °C	0,8454	24	7,712	< 0,0001	0,0130
15 ‰	-5,324	pH 8	25 °C	0,9326	24	5,620	0,0003	0,3240
35 ‰	-12,20	pH 8	25 °C	0,7261	24	9,598	< 0,0001	0,0064
Τιμές (NT)	Τέλειος συνδυασμός	-	1,000		3	0	-	-

Παράμετρος 5: Επίδραση του ενζυμικού προφίλ στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Από πειραματικές εκτροφές λαβρακιών σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς στην ιχθυοκαλλιεργητική μονάδα Σελόντα, συλλέχθηκαν πυλωρικά τυφλά από τα πεπτικά συστήματα ιχθύων τα οποία είχαν σιτιστεί με διαφορετικά σιτηρέσια που περιείχαν διαφορετικές πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης. Τα σιτηρέσια ήταν τα RH09, RH10, RH11, RH17, RH18 και RH19, των οποίων οι συστάσεις περιγράφονται στον Πίνακα 2.2. Η μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού προφίλ έγινε σε θερμοκρασία 25 °C, pH 8 και αλατότητα 0 ‰, αλλά υπό αυξανόμενη αναλογία της ποσότητας του πρωτεϊνικού υποστρώματος / U ενζυμικής δραστηριότητας. Επίσης το χρησιμοποιούμενο σιτηρέσιο σε αυτό το πείραμα ήταν ίδιο με αυτό των προηγούμενων πειραμάτων (σιτηρέσιο CB). Σε καθένα από τα ενζυμικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από λαβράκια που λάμβαναν διαφορετικό σιτηρέσιο, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης και των καρβοξυπεπτιδασών A και B, καθώς και η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών. Η ποσότητα καθενός εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις πεπτικότητας *in vitro* διέφερε και υπολογίστηκε έτσι ώστε να περιέχει 1 U ολικών αλκαλικών πρωτεασών.

Σε αυτό το πείραμα προσαρμόστηκε η αναπτυσσόμενη εξίσωση ώστε να συμπεριλάβει και τις δραστηριότητες των διαφόρων πεπτικών πρωτεασών, της θρυψίνης, της χυμοθρυψίνης και των καρβοξυπεπτιδασών A και B. Οι μεταβλητές παράμετροι που διαμορφώθηκαν ήταν οι εξής:

Η επίδραση της χυμοθρυψίνης αντιπροσωπεύεται από τη μεταβλητή παράμετρο **NCHTR**.

Η επίδραση της θρυψίνης αντιπροσωπεύεται από τη μεταβλητή παράμετρο **NTRP**.

Η επίδραση της καρβοξυπεπτιδάσης A αντιπροσωπεύεται από τη μεταβλητή παράμετρο **NCPA**.

Η επίδραση της καρβοξυπεπτιδάσης B αντιπροσωπεύεται από τη μεταβλητή παράμετρο **NCPB**.

Η εισαγωγή αυτών των παραμέτρων οδήγησε στη διαμόρφωση μιας εξίσωσης όγδοης τάξης:

$$Y = f(x) + f(pH) + f(T^{\circ}C) + f(S\%) + f(TRP) + f(CHTR) + f(CPA) + f(CPB) + f(P)) = (21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428) + (-23,10 + (1,296 + 23,10) / (1 + 10^{(5,955 - pH)})) + (-6,783 + (0,2908 + 6,783) / (1 + 10^{(19,45 - T^{\circ}C)})) + (-12,20 + (0,5186 + 12,20) / (1 + 10^{(S\% - 15,07)})) + (10^{(-1,998 + 1,153 * \log(TRP \text{ U/mg protein}))}) + (-23,84 + 9,082 * \log(CHTR \text{ U/mg protein})) + (10^{(0,3626 + 0,8114 * \log(CPA))}) + (10^{(-1,846 + 6,399 * CPB)}).$$

Τα δεδομένα ταξινομήθηκαν σε κατηγορίες ανά συγκέντρωση σιτηρεσίου, επίπεδο pH, αλατότητα, θερμοκρασία και διατροφικό ιστορικό (δραστηριότητα πεπτικών πρωτεασών).

Χρησιμοποιήθηκε μια παράμετρος η οποία μεταβάλλεται με την μεταβολή του συνόλου των μεταβλητών παραμέτρων της κάθε πεπτικής πρωτεάσης. Η νέα παράμετρος ονομάστηκε παράμετρος NE και εξετάστηκε κάθε φορά η μεταβολή της με μία από τις μελετημένες δραστικότητες πεπτικών ενζύμων, ως εξής:

A. Εξέταση της μεταβλητής παραμέτρου NTRP η οποία μεταβάλλεται με την μεταβολή της δραστικότητας της θρυψίνης

Χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος NTRP η οποία μεταβάλλεται με τη μεταβολή της δραστικότητας της θρυψίνης.

Log-log line, X & Y είναι log: $Y=10^{(Y\text{Intercept} + \text{Slope}*\log(X))}$

Αυτή η παράμετρος μεταβάλλεται με δύο ταχύτητες σε σχέση με το βαθμό της ενζυμικής υδρόλυσης, ταχύτερα στην αρχή και πιο αργά στο τέλος. Η μεταβολή γίνεται με θετικό ρυθμό των βαθμών της ενζυμικής υδρόλυσης.

Οι έξι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NTRP συνδέθηκαν παράλληλα με τις τιμές των δραστικότητων θρυψίνης με την ακόλουθη προστιθέμενη εξίσωση:

$$NTRP = f(\text{TRP}) = (10^{(-1,998 + 1,153*\log(\text{TRP U/mg protein.}))})$$

Συντελεστής συσχέτισης (r^2) = 0,8450

Τιμή ελέγχου (P value) της εξέτασης επαλήθευσης = 0,9000 (μη σημαντική).

Τυπικό σφάλμα = 0,8976

B. Εξέταση της μεταβλητής παραμέτρου NCHTR η οποία μεταβάλλεται με τη μεταβολή της δραστικότητας της χυμοθρυψίνης

Για την προσαρμογή αυτής της παραμέτρου NCHTR στην αναπτυσσόμενη εξίσωση, η οποία μεταβάλλεται θετικά με την αύξηση των βαθμών της ενζυμικής υδρόλυσης, συνδυάστηκαν οι τιμές τις με την ακόλουθη γραμμική εξίσωση, η οποία είχε καλύτερο συντελεστή συσχέτισης, με μικρό σφάλμα:

Semilog line, X είναι log, Y είναι γραμμική: $Y=Y\text{intercept} + \text{Slope}*\log(X)$

$$NCHTR = f(\text{CHTR}) = (-23,84 + 9,082*\log(\text{CHTR}))$$

Συντελεστής συσχέτισης (r^2) = 0,9423

Τιμή ελέγχου (P value) της εξέτασης επαλήθευσης = 0,7000 (μη σημαντική).

Τυπικό σφάλμα = 0,5477

Γ. Εξέταση της μεταβλητής παραμέτρου NCPA η οποία μεταβάλλεται με τη μεταβολή της δραστικότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A

Αυτή η παράμετρος μεταβάλλεται θετικά με την αύξηση της δραστικότητας της καρβοξυπεπτιδάσης A. Ο ρυθμός της αύξησης αλλάζει στο τέλος της καμπύλης, με αργό

ρυθμό. Έτσι η σύνδεση των τιμών της ήταν αδύνατο να γίνει με τις κλασικές εξισώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την σύνδεση των προηγούμενων περιβαλλοντολογικών και βιολογικών παραμέτρων. Χρησιμοποιήθηκε ειδική εξίσωση για την περιγραφή της επίδρασης της καρβοξυπεπτιδάσης A, υποθέτοντας ότι η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A αλλάζει με λογαριθμικό ρυθμό ο οποίος αποτυπώνεται σε γραμμική συσχέτιση:

Log-log line, X & Y είναι log: $Y = 10^{(Y\text{Intercept} + \text{Slope} * \log(X))}$ (GraphPad Prism , 2010)

Σταθερές τιμές της εξίσωσης: $NCPA = f(CPA) = (10^{(0,3626 + 0,8114 * \log(CPA))})$

Συντελεστής συσχέτισης (r^2) = 0,6220

Τιμή ελέγχου (P value) της εξέτασης επαλήθευσης = 0,4000 (μη σημαντική).

Τυπικό σφάλμα = 1,402

Δ. Εξέταση της μεταβλητής παραμέτρου NCPB, η οποία μεταβάλλεται με τη μεταβολή της δραστηριότητας της καρβοξυπεπτιδάσης B

Αυτή η παράμετρος μεταβάλλεται θετικά και με αργό ρυθμό σε σχέση με τη μεταβολή των βαθμών της ενζυμικής υδρόλυσης. Συνδυάστηκαν οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου με την ακόλουθη εξίσωση, ως εξής:

Semilog line, X είναι linear, Y είναι log: $Y = 10^{(Y\text{Intercept} + \text{Slope} * X)}$

Σταθερές τιμές της εξίσωσης: $NCPB = f(CPB) = (10^{(-1,846 + 6,399 * CPB)})$

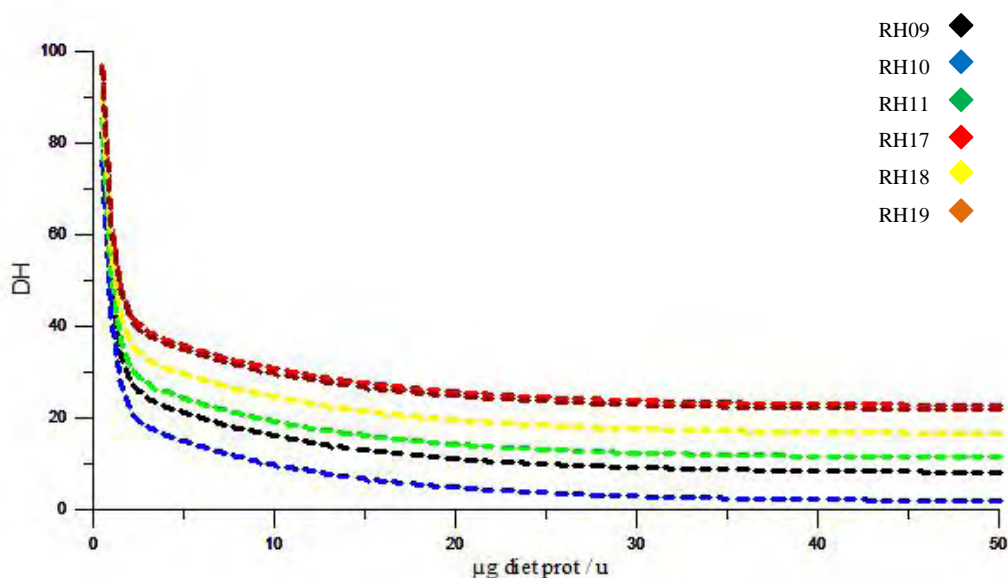
Συντελεστής συσχέτισης (r^2) = 0,8060

Τιμή ελέγχου (P value) της εξέτασης επαλήθευσης = 0,4000 (μη σημαντική).

Τυπικό σφάλμα = 1,004

Πίνακας 2.24.: Οι δραστηριότητες των διάφορων πεπτικών ενζύμων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου CB

Διατροφικό ιστορικό	Ολικές αλκαλικές πρωτεάσες	Θρυψίνη	Χυμοθρυψίνη	Καρβοξυ-πεπτιδάση A	Καρβοξυ-πεπτιδάση B
RH11	6,898	128,138	478,445	2,179	0,39
RH19	1,110	7,380	936,770	0,177	0
RH18	0,120	3,270	1128,500	0,440	0,28
RH17	0,664	3,700	276,240	0,310	0,31
RH10	17,800	145,440	675,840	0,685	0,34
RH09	18,790	176,690	657,730	0,800	0,35



Εικόνα 2.19.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης όγδοης τάξης του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου από διαφορετικά εκχυλίσματα πεπτικών πρωτεασών (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω πειράματα δεν περιείχαν ισάριθμες επαναλήψεις και μετρήσεις λόγω της περιορισμένης ποσότητας κατάλληλων ενζυμικών εκχυλισμάτων, όταν θεωρήθηκε ήσσονος σημασίας ο υπολογισμός αυτών, καθώς για την ανάπτυξη εξισώσεων διαφορικού λογισμού, δεν είναι απαραίτητος ίσος αριθμός παρατηρήσεων N ή όταν οι διαφορές ήταν πολύ μικρές μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων, όπως για παράδειγμα, στις συγκεντρώσεις του πρωτεϊνικού υποστρώματος 50 μg και 30 μg / 10ml / U

ενζυμικής δραστηριότητας οι διαφορές στο βαθμό της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν πολύ μικρές.

Παράμετρος 6: επίδραση της όξινης προ-πέψης στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Φθάνοντας στην τελευταία προσαρμογή της εξίσωσης, για την πρόβλεψη των βαθμών της ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών στις διάφορες περιβαλλοντολογικές και βιολογικές συνθήκες, έγινε υπόθεση της μεταβλητής παραμέτρου NP, η οποία μεταβάλλεται με την μεταβολή του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης κατά την όξινη προ-πέψη σε διαφορετικά pH. Οι τιμές αυτής της παραμέτρου συνδυάστηκαν με γραμμική συσχέτιση με το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης κατά την όξινη προ-πέψη σε pH 3 ή σε pH 4, αναπτύσσοντας την εξίσωση στην ένατη τάξη. Προσαρμόστηκε αυτή η τελευταία παράμετρος με τρόπο ώστε να μπορούμε να την παραβλέπουμε σε τυχόν προβλέψεις αλκαλικής πέψης.

Straight line: $Y = Y_{\text{Intercept}} + \text{Slope} * X$

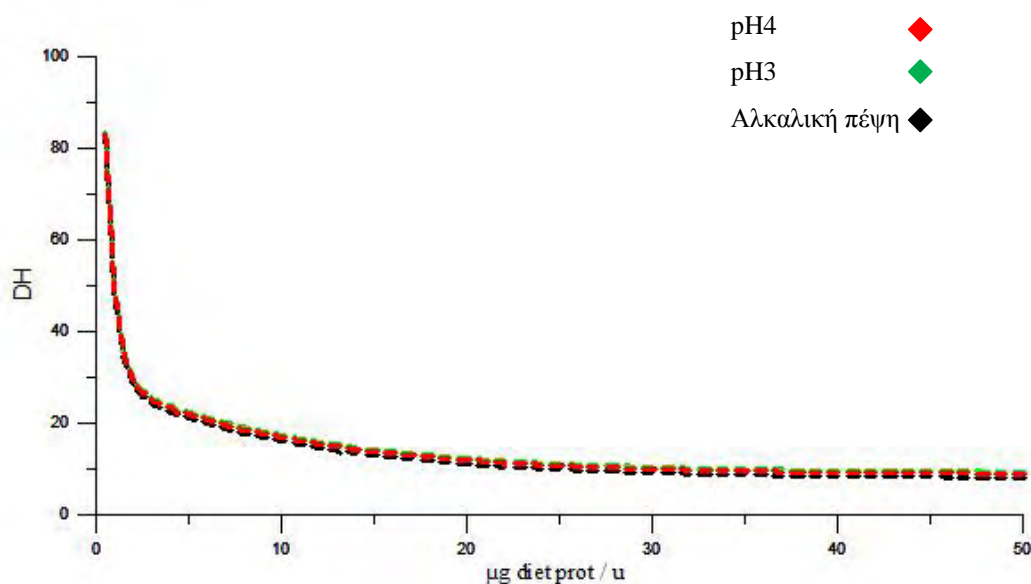
Χαρακτηριστικά εξίσωσης

Έγιναν οι τελικές αναλύσεις των πειραματικών δεδομένων για την ανάπτυξη της εξίσωσης ώστε να προβλέπει τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα NP της προ-πέψης. Οι ποιοτικές εξετάσεις (τα μαθηματικά κριτήρια) είναι τελικές. Οι υψηλές τιμές συσχετίσεων αποδεικνύουν ότι τα πειραματικά δεδομένα κατανέμονται ακολουθώντας την αναπτυσσόμενη εξίσωση (Πίνακας 2.25). Τα πειραματικά δεδομένα δεν απέχουν πολύ από τα προβλεπόμενα δεδομένα της αναπτυσσόμενης εξίσωσης όπως αποδεικνύει η εξέταση επαλήθευσης της εξίσωσης η οποία περιέχει επιτυχείς επαληθεύσεις. Γενικά τα πειραματικά δεδομένα κατανέμονται φυσικά σύμφωνα με την εξέταση του D'Agostino-Pearson. Οι τιμές της παραμέτρου NP μειώνονταν με την αύξηση του επιπέδου pH από το 3 στο 4 κατά την όξινη προ-πέψη των διατροφικών πρωτεϊνών. Παράλληλα μειώνεται ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών. Η εξίσωση ένατης τάξης διαμορφώνεται ως εξής:

$$Y = f(x) + f(\text{pH}) + f(T^{\circ}\text{C}) + f(S\%) + f(\text{TRP}) + f(\text{CHTR}) + f(\text{CPA}) + f(\text{CPB}) + f(P) = \\ (21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428) + (-23,10 + (1,296 + 23,10) / (1 + 10^{(5,955 - \text{pH})})) + (- \\ 6,783 + (0,2908 + 6,783) / (1 + 10^{(19,45 - T^{\circ}\text{C})})) + (-12,20 + (0,5186 + 12,20) / (1 + 10^{(S\% - 15,07)})) + (10^{(- \\ 1,998 + 1,153 * \log(\text{TRP U/mg protein.}))}) + (-23,84 + 9,082 * \log(\text{CHTR U/mg protein.})) + (10^{(0,3626 + 0,8114 \\ * \log(\text{CPA}))}) + (10^{(-1,846 + 6,399 * \text{CPB})}) + (2,424 - 0,4080 * P).$$

Πίνακας 2.25.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης ένατης τάξης. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις

Όξινη προηγούμενη πέψη	Μεταβλητές τιμές (NP)	Συνθήκες πειράματος	Όνομα καμπύλης	r^2	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
Χωρίς όξινη προηγούμενη πέψη	0	pH 8, 0 ‰, 25 °C	RH11	0,8845	24	10,83	0,0876*	0,3317
			RH19	0,8239	24	15,85	< 0.0001	0,1911
			RH18	0,8077	5	12,86	-	-
			RH17	0,7964	24	17,88	< 0.0001	0,2004
			RH10	0,6964	24	11,86	0,0267	0,0380
			RH09	0,9406	24	6,071	0,3231*	0,7299
		pH 8, 35 ‰, 25 °C	RH09	0,7247	24	9,624	< 0.0001	0,0064
		pH 8, 15 ‰, 25 °C	RH09	0,9315	24	5,663	0,0003	0,3240
		pH 8, 0 ‰, 20 °C	RH09	0,9610	24	4,836	0,2673*	0,5756
		pH 8, 0 ‰, 15 °C	RH09	0,8422	24	7,791	< 0.0001	0,0130
		pH 7, 0 ‰, 25 °C	RH09	0,9497	21	5,534	0,0150	0,4736
		pH 6, 0 ‰, 25 °C	RH09	0,8049	12	9,956	0,0469	0,8128
3	1.200	pH 8, 0 ‰, 25 °C	RH09	0,8143	24	11,09	0,1235*	0,0368
4	0.792	pH 8, 0 ‰, 25 °C	RH09	0,9046	24	8,619	< 0.0001	0,7235
Μεταβλητές τιμές (NP)	-	1,000	-	2	0	-	-	-
Μεταβλητές τιμές (NE)	-	Τα εξεταζόμενα σημεία ήταν έξι για τις διάφορες δραστηρότητες των ενζύμων και συνδυαστήκαν με 4 διαφορετικές εξισώσεις μέτρια						



Εικόνα 2.20.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης ένατης τάξης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου που έχουν υποστεί όξινη προ-πέψη σε διαφορετικά pH (από 302 εξεταζόμενα σημεία).

Πίνακας 2.26.: Ποιοί από τους διάφορους παράγοντες επηρεάζουν το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης περισσότερο ($\Delta f(x)$, $\Delta f(pH)$, $\Delta f(T^{\circ}C)$, $\Delta f(S\%)$, $\Delta f(E)$, $\Delta f(P)$)

Μεταβλητή παράμετρος	Διαφορά μεταβλητών τιμών	Σειρά με την οποία παράγοντες επηρεάζουν το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης
Συγκέντρωση σιτηρεσίου	74,13248	1
NpH	24,148	2
NT	7,0738	5
NS	12,7186	4
NE	14,692	3
NP	1,200	6

Πίνακας 2.27.: Ποιός βαθμός, της ενζυμικής υδρόλυσης (a) ή της αυτουδρόλυσης (b) επηρεάζεται περισσότερο από τους διάφορους παράγοντες και με ποία σειρά ($((\Delta f(x_a)-\Delta f(x_b)), (\Delta f(pH_a)-\Delta f(pH_b)), (\Delta f(T^{\circ}C_a)-\Delta f(T^{\circ}C_b)), \Delta f(S\%_{a})-\Delta f(S\%_{b})))$)

Μεταβλητή παράμετρος	Σειρά με την οποία παράγοντες επηρεάζουν περισσότερο	Διαφορά μεταβλητών τιμών	
		Αυτοϋδρόλυση	Ενζυμική υδρόλυση
Συγκέντρωση σιτηρεσίου	⁽¹⁾ 31,50179	42,63069	74,13248
NpH	⁽²⁾ 15,912	8,236	24,148
NT	⁽⁴⁾ 4,8788	2,195	7,0738
NS	⁽³⁾ 5,1126	7,606	12,7186

Πίνακας 2.28.: Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (pH και θερμοκρασία)

Συγκέντρωση σιτηρεσίου μg	pH	θερμοκρασία	αλατότητα	Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης	Προβλεπόμενη βαθμοί αυτοϋδρόλυσης
0,5	8	25 °C	0‰	54,69	56,04
0,75	8	25 °C	0‰	50,46	41,48
1	8	25 °C	0‰	40,57	34,79
1,5	8	25 °C	0‰	37,02	29,52
3,0	8	25 °C	0‰	16,95	24,25
5,0	8	25 °C	0‰	10,82	20,20
10	8	25 °C	0‰	8,82	15,52
30	8	25 °C	0‰	7,90	13,43
50	8	25 °C	0‰	5,01	13,41
0,5	7	25 °C	0‰	56,57	49,24
0,75	7	25 °C	0‰	44,73	34,67
1	7	25 °C	0‰	42,78	27,98
1,5	7	25 °C	0‰	32,79	22,71
3	7	25 °C	0‰	15,06	17,45
5	7	25 °C	0‰	10,78	13,40
10	7	25 °C	0‰	5,51	8,72
30	7	25 °C	0‰	2,90	6,63
50	7	25 °C	0‰	2,51	6,61
0,5	6	25 °C	0‰	39,88	44,63
0,75	6	25 °C	0‰	19,92	30,07
1	6	25 °C	0‰	15,38	23,38
1,5	6	25 °C	0‰	7,04	18,11
3	6	25 °C	0‰	15,06	12,84
0,5	8	20 °C	0‰	78,32	55,89
0,75	8	20 °C	0‰	39,25	41,33
1	8	20 °C	0‰	37,63	34,64
1,5	8	20 °C	0‰	23,92	29,37
3	8	20 °C	0‰	17,87	24,10
5	8	20 °C	0‰	16,57	20,05
10	8	20 °C	0‰	8,91	15,37
30	8	20 °C	0‰	2,84	13,28
50	8	20 °C	0‰	2,72	13,26
0,5	8	15 °C	0‰	48,13	53,85
0,75	8	15 °C	0‰	40,13	39,28
1	8	15 °C	0‰	36,25	32,59
1,5	8	15 °C	0‰	23,77	27,32
3	8	15 °C	0‰	12,41	22,06
5	8	15 °C	0‰	10,07	18,00
10	8	15 °C	0‰	8,56	13,33
30	8	15 °C	0‰	3,95	11,24
50	8	15 °C	0‰	2,39	11,22

Πίνακας 2.29.: Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (Αλατότητα)

Συγκέντρωση σιτηρεσίου μg	pH	θερμοκρασία	αλατότητα α	Βαθμοί αυτοϋδρόλυσης	Προβλεπόμενη βαθμοί αυτοϋδρόλυσης
0,5	8	25 °C	15‰	36,25	51,25
0,75	8	25 °C	15‰	29,26	36,69
1	8	25 °C	15‰	30,08	30,00
1,5	8	25 °C	15‰	29,45	24,73
3	8	25 °C	15‰	18,70	19,46
5	8	25 °C	15‰	16,69	15,41
10	8	25 °C	15‰	8,54	10,73
30	8	25 °C	15‰	6,31	8,64
50	8	25 °C	15‰	6,19	8,62
0,5	8	25 °C	35‰	66,32	63,87
0,75	8	25 °C	35‰	25,00	27,18
1	8	25 °C	35‰	22,56	21,91
1,5	8	25 °C	35‰	20,44	16,64
3	8	25 °C	35‰	11,72	12,59
10	8	25 °C	35‰	8,77	7,91
30	8	25 °C	35‰	8,41	5,82
50	8	25 °C	35‰	5,02	5,81

Πίνακας 2.30.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (pH)

Συγκέντρωση σιτηρεσίου μg / U	pH	θερμοκρασία	αλατότητα	Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης	Προβλεπόμενη βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης
0,5	8	25 °C	0‰	85,13	81,62
0,75	8	25 °C	0‰	55,05	60,53
1	8	25 °C	0‰	49,94	47,30
1,5	8	25 °C	0‰	27,06	33,61
3	8	25 °C	0‰	24,23	23,65
10	8	25 °C	0‰	18,05	15,41
30	8	25 °C	0‰	11,32	8,49
50	8	25 °C	0‰	10,17	7,49
0,5	7	25 °C	0‰	83,26	79,82
0,75	7	25 °C	0‰	49,23	58,73
1	7	25 °C	0‰	48,47	45,50
1,5	7	25 °C	0‰	27,62	31,81
3	7	25 °C	0‰	22,35	21,85
10	7	25 °C	0‰	14,74	13,61
50	7	25 °C	0‰	5,69	5,69

Πίνακας 2.31.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (pH, θερμοκρασία, αλατότητα)

Συγκέντρωση σιτηρεσίου μg / U	pH	θερμοκρασία	αλατότητα	Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης	Προβλεπόμενη βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης
0,5	6	25 °C	0‰	67,63	70,27
0,75	6	25 °C	0‰	24,65	49,18
1	6	25 °C	0‰	19,63	35,95
1,5	6	25 °C	0‰	11,31	22,26
0,5	8	20 °C	0‰	79,07	80,06
0,75	8	20 °C	0‰	56,46	58,97
1	8	20 °C	0‰	47,00	45,74
1,5	8	20 °C	0‰	25,54	32,05
3	8	20 °C	0‰	23,23	22,09
10	8	20 °C	0‰	17,65	13,86
30	8	20 °C	0‰	6,27	6,94
50	8	20 °C	0‰	6,25	5,93
0,5	8	15 °C	0‰	57,63	74,55
0,75	8	15 °C	0‰	55,42	53,45
1	8	15 °C	0‰	37,75	40,23
1,5	8	15 °C	0‰	22,15	26,54
3	8	15 °C	0‰	17,77	16,57
10	8	15 °C	0‰	15,00	8,34
30	8	15 °C	0‰	5,97	1,42
50	8	15 °C	0‰	5,65	0,41
0,5	8	25 °C	35‰	64,26	68,90
0,75	8	25 °C	35‰	34,71	47,81
1	8	25 °C	35‰	25,88	34,58
1,5	8	25 °C	35‰	12,61	20,89
3	8	25 °C	35‰	12,56	15,93
10	8	25 °C	35‰	10,96	10,69
30	8	25 °C	35‰	8,02	5,69
50	8	25 °C	35‰	7,36	3,69
0,5	8	25 °C	15‰	66,67	75,77
0,75	8	25 °C	15‰	52,70	54,68
1	8	25 °C	15‰	36,32	41,45
1,5	8	25 °C	15‰	35,25	27,76
5	8	25 °C	15‰	16,17	14,58
10	8	25 °C	15‰	9,32	9,563
30	8	25 °C	15‰	6,23	6,65
50	8	25 °C	15‰	5,48	2,64

Πίνακας 2.32.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (Ενζυμικό προφίλ)

Συγκέντρωση σιτηρεσίου μg / U	pH	θερμοκρασία	αλατότητα	Ενζυμικό προφίλ	Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης	Προβλεπόμενη βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης
0,5	8	25 °C	0‰	RH19	100	98,74
0,75	8	25 °C	0‰	RH19	96,42	90,62
1	8	25 °C	0‰	RH19	88,23	89,49
1,5	8	25 °C	0‰	RH19	45,34	58,66
3	8	25 °C	0‰	RH19	33,70	27,84
10	8	25 °C	0‰	RH19	17,10	21,66
30	8	25 °C	0‰	RH19	8,29	8,93
50	8	25 °C	0‰	RH19	4,50	4,75
0,5	8	25 °C	0‰	RH18	100	97,41
0,75	8	25 °C	0‰	RH18	81,63	87,33
1	8	25 °C	0‰	RH18	54,75	52,22
1,5	8	25 °C	0‰	RH18	18,75	29,34
3	8	25 °C	0‰	RH18	37,25	26,51
0,5	8	25 °C	0‰	RH17	100	95,13
0,75	8	25 °C	0‰	RH17	100	85,05
1	8	25 °C	0‰	RH18	90,68	79,94
1,5	8	25 °C	0‰	RH17	54,32	57,06
3	8	25 °C	0‰	RH17	33,57	24,23
10	8	25 °C	0‰	RH17	12,74	12,05
30	8	25 °C	0‰	RH17	6,35	6,32
50	8	25 °C	0‰	RH17	2,64	2,17
0,5	8	25 °C	0‰	RH10	59,38	69,57
0,75	8	25 °C	0‰	RH10	62,80	64,38
1	8	25 °C	0‰	RH10	36,07	38,67
1,5	8	25 °C	0‰	RH10	34,52	32,49
3	8	25 °C	0‰	RH10	31,86	24,61
10	8	25 °C	0‰	RH10	16,40	18,75
30	8	25 °C	0‰	RH10	8,11	9,68
50	8	25 °C	0‰	RH10	4,97	5,38
0,5	8	25 °C	0‰	RH11	96,32	96,09
0,75	8	25 °C	0‰	RH11	77,84	76,01
1	8	25 °C	0‰	RH11	40,08	40,90
1,5	8	25 °C	0‰	RH11	39,71	38,02
3	8	25 °C	0‰	RH11	23,64	25,19
5	8	25 °C	0‰	RH11	10,82	10,01
10	8	25 °C	0‰	RH11	8,82	9,28
30	8	25 °C	0‰	RH11	7,90	6,49
50	8	25 °C	0‰	RH11	5,01	4,13

Πίνακας 2.33.: Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης και προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε διάφορες συνθήκες (όξινης προ-πέψης)

Συγκέντρωση σιτηρεσίου μg / U	pH	θερμοκρασία	αλατότητα	pH όξινης προ-πέψης	Βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης	Προβλεπόμενοι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης
0,5	8	25 °C	0‰	3	77,84	76,31
0,75	8	25 °C	0‰	3	45,84	46,20
1	8	25 °C	0‰	3	30,94	31,14
1,5	8	25 °C	0‰	3	22,83	28,23
3	8	25 °C	0‰	3	10,11	15,45
10	8	25 °C	0‰	3	7,00	8,29
30	8	25 °C	0‰	3	3,71	4,54
50	8	25 °C	0‰	3	1,99	2,36
0,5	8	25 °C	0‰	4	88,44	85,93
0,75	8	25 °C	0‰	4	46,54	45,85
1	8	25 °C	0‰	4	48,41	50,74
1,5	8	25 °C	0‰	4	33,38	27,86
3	8	25 °C	0‰	4	16,45	15,03
10	8	25 °C	0‰	4	6,45	6,85
30	8	25 °C	0‰	4	3,88	3,12
50	8	25 °C	0‰	4	2,99	1,97

2.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από αμινοξέα ως δομικά μόρια, παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλες τις βιολογικές διεργασίες. Τα αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας πολυπεπτιδικές αλυσίδες, όπου κάθε α -Καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος ενώνεται με την α -αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος με αμιδικό δεσμό, ενώ πολλά αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, διαμορφώνοντας την τρισδιάστατη μορφή των πρωτεϊνών. Η σύνθεση της πρωτεΐνης από αμινοξέα και η πεπτικότητα της ελέγχει την ποσότητα και το ρυθμό απορρόφησης του κάθε αμινοξέος (Alpers, 1994). Με την υδρόλυση διατροφικής πρωτεΐνης στο σύστημα pH-stat απελευθερώνεται ενέργεια. Η ανθεκτικότητα των πρωτεϊνών στην αποδόμηση οφείλεται στο ότι το αμινοτελικό άκρο της είναι ακετολιωμένο. Το pH-stat ποσοτικοποιεί τον αριθμό υδρολυμένων δεσμών πεπτιδίων μιας πρωτεΐνης, ανεξάρτητα από τον τόπο της υδρόλυσης. Το σύστημα pH-stat ποσοτικοποιεί τους διασπώμενους πεπτιδικούς δεσμούς των διατροφικών πρωτεϊνών κατά την υδρόλυση τους, χωρίς να διαφοροποιεί την υδρόλυση με ένδο ή έξω πρωτεάσες. Ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης αντιπροσωπεύει τον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών κατά την υδρόλυση μιας πρωτεΐνης (Alarcon et al., 2001).

Η τεχνική για τη μέτρηση της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *In vitro*, δεν εφαρμόζεται μόνο για την απόκτηση μιας ένδειξης για τη διασπώμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι διαθέσιμη για έναν οργανισμό, αλλά και για να λάβουμε λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τους διάφορους μηχανισμούς δράσης των ενζύμων και των πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα της διαδικασίας πέψης (Alpers, 1994).

Το pH-stat (Τιτλοδότηση) αποδείχθηκε ιδιαίτερα πολύτιμο στην πρόβλεψη της πεπτικότητας της πρωτεΐνης στα τρόφιμα (Eggum et al., 1989), (McDonough et al., 1990), (Swaisgood & Catignami, 1991), (Diniz & Martin, 1996 & 1997), (Munilla-Mordn & Saborido-Rey, 1996), και έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών για ιχθύς γλυκών και θαλάσσιων υδάτων, όπως η πέστροφα (Hidalgo et al., 1999), ο σολομός από τους Dimes et al. (1994), στα αποτελέσματα των οποίων υπήρχε καλός συντελεστής συσχέτισης μεταξύ *in vivo* και *in vitro* και απεδείχθη ότι είναι καλύτερη από τη μέθοδο pH-shift (Dimes & Haard, 1994).

Με βάση τα θετικά αποτελέσματα της μεθόδου του pH-stat, κατά την εφαρμογή της για τη μελέτη διαφόρων παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν το συντελεστή πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* (Alarcon et al., 2002) στην τσιπούρα, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες τεχνικές για την πραγματοποίηση του συνόλου των πειραμάτων στην παρούσα μελέτη. Οι παράγοντες τους οποίους μελέτησε ο Alarcon ήταν: η πηγή του ενζύμου το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα διάφορα πειράματα (ένζυμα εμπορίου και ένζυμα αποσπασμένα από τα πυλωρικά τυφλά των ιχθύων, όπου τα δεύτερα έδωσαν καλύτερο βαθμό ενζυμικής

υδρόλυσης από τα πρώτα), η επίδραση της όξινης προηγούμενης πέψης των διατροφικών πρωτεϊνών, η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, η επίδραση των αναστολέων οι οποίοι βρίσκονται στις διάφορες πηγές πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ιχθύων. Επίσης μελετήθηκε και η γραμμή βάσης (Base line) των βαθμών αυτοϋδρόλύσεων ως διορθωτική γραμμή για την ενζυμική υδρόλυση (Alarcon et al., 2002). Επίσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος pH-stat στα οστρακοειδή (Ezquerria, 1997), (Lazo, et al., 1998).

Στις πρώτες pH μεθόδους, οι οποίες είναι βασισμένες στην πτώση του pH κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης, μερικές ουσίες στην πρωτεΐνη μπορεί να επηρεαστούν από την πτώση του pH, με συνέπεια να επηρεαστούν τα αποτελέσματα σε αυτήν την *In vitro* μέθοδο εκτίμησης πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης. Η μέθοδος του pH-stat έχει διορθώσει αυτόν τον τρόπο εκτίμησης της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης, με τη διατήρηση του επιπέδου pH σταθερού κατά την διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης. Μερικοί συγγραφείς-ερευνητές διαφωνούν για την εγκυρότητα της μεθόδου pH-stat για τη μέτρηση της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης, επειδή οι διαφορές στην ικανότητα αποθήκευσης και αποδόμησης των πρωτεϊνών μπορεί να παρεμποδίσει τη μέτρηση της υδρόλυσης της πρωτεΐνης (Clancy et al., 1995; Hidalgo et al., 1999). Ο προσδιορισμός μιας γραμμής βάσης, η οποία αντιπροσωπεύεται από το βαθμό αυτοϋδρόλυσης για το εξεταζόμενο σιτηρέσιο μπορεί να είναι δείκτης της αποδόμησης και αποθηκευτικής ικανότητας των πρωτεϊνών (Choubert et al., 1988; Mutilangi et al., 1995).

Στην αναπτυσσόμενη εξίσωση το ανώτερο όριο των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης ήταν μεγαλύτερο από το ανώτερο όριο βαθμών αυτοϋδρόλυσης (Εικόνα 2.15), με 32,5 βαθμούς διαφορά στη συγκέντρωση 0,5 μg διατροφικής πρωτεΐνης / U, οι οποίοι μειώνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου έως το 1 μg διατροφικής πρωτεΐνης / U στη συγκέντρωση του σιτηρεσίου CB. Τέτοια διαφορά οφείλεται στο θετικό ρόλο τον οποίο παίζουν τα ένζυμα ως καταλύτες στην υδρόλυση των πρωτεϊνών και στα ενδογενή ένζυμα του σιτηρεσίου, τα οποία συμβάλλουν στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης και δεν υποβιβάζονται από τα προστιθέμενα πρωτεολυτικά ένζυμα.

Η κατανάλωση του αλκαλικού αντιδραστήρα (NaOH) από το σύστημα pH-stat, η οποία μετριέται σε πειράματα αυτοϋδρόλύσεων δεν προβλέπει επαρκώς το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των σιτηρεσίων επειδή το εξωγενές ένζυμο που προστίθενται κατά την υδρόλυση μπορεί να αδρανοποιήσει τα ενδογενή ένζυμα, πράγμα το οποίο δεν συνέβη με το σιτηρέσιο CB.

Κατά την υδρόλυση για την επίτευξη του επιθυμητού βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης σε μια ώρα, τα ένζυμα των ιχθύων χάνουν την δραστηριότητά τους με σταθερό ρυθμό έως την πλήρη αδρανοποίηση με αποτέλεσμα ένα σταθερό ρυθμό υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων.

Στις μελέτες, οι οποίες αφορούν την τεχνητή υδρόλυση της πρωτεΐνης για τη μέτρηση της πεπτικότητας, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν τα συνολικά πειραματικά δεδομένα των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης, οι οποίοι προκύπτουν από τις εντερικές πρωτεάσεις, πράγμα το οποίο ακολουθήθηκε σε αυτά τα πειράματα.

Οι Pedersen & Eggum, (1983) διαπίστωσαν ότι οι γραμμές διορθώσεων των βαθμών αυτοϋδρόλύσεων δεν οδήγησαν σε μια ακριβή εκτίμηση των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης με την τεχνητή μέτρηση της πεπτικότητας *in vitro*. Κατά τη μέτρηση της δυνατότητας των ενζύμων των ιχθύων να υδρολύσουν μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, θεωρείται βασικό οι βαθμοί αυτοϋδρόλύσεων να ληφθούν υπόψη στις συνολικές μετρήσεις.

Η αυξημένη ποσότητα του σιτηρεσίου μειώνει το ποσοστό πεπτικότητας σε όλες τις συνθήκες οι οποίες μελετήθηκαν. Στις μικρές ποσότητες διατροφικής πρωτεΐνης σιτηρεσίου υπήρχαν σημαντικές διαφορές, οι οποίες μειώνονταν στις μεγάλες ποσότητες, πράγμα το οποίο συνέβη κατά την ενζυμική υδρόλυση και την αυτοϋδρόλυση. Αυτή η συμπεριφορά των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων κατά την υδρόλυση, επιβεβαιώνει την καταλληλότητα χρήσης των βαθμών αυτοϋδρόλύσεων ως διαθρωτική γραμμή των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης της διατροφικής πρωτεΐνης.

Η υψηλή υδρόλυση μπορεί να οφείλεται στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης ή στην αποθηκευτική ικανότητα της πρωτεΐνης ή και στα δύο (Mutilangi et al., 1995).

Το ποσοστό των αμινοξέων τα οποία είναι ευπαθή σε σχίσσιμο από τις αλκαλικές πρωτεάσες όπως θρυψίνη και χυμοθρυψίνη όταν είναι μεγαλύτερο αποδίδει υψηλή υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων (Mutilangi et al., 1995).

Η ευαισθησία του δεσμού του πεπτιδίου εξαρτάται από την προσβασιμότητα και την ευελιξία των πρωτεασών (Kato et al., 1985). Η δυνατότητα πρόσβασης και εντοπισμού των αμινοξέων (λυσίνη, αργινίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη) ειδικά για τη δράση των πρωτεασών έχει μεγάλη σημασία λόγω της περιορισμένης εξειδίκευσης των κυρίων πρωτεασών θρυψίνης και χυμοθρυψίνης (Alarcon et al., 2002).

Η διάρκεια της κάθε αντίδρασης καθορίστηκε σε μια ώρα, επειδή η επιμήκυνση του χρόνου υδρόλυσης των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση πεπτιδίων πολύ μικρού μοριακού βάρους (Alarcon et al., 2001).

Μαθηματικά, Το ολοκλήρωμα της αναπτυσσόμενης εξίσωσης ως συνάρτηση μεταβλητών παραμέτρων είναι το ποσό που απαιτείται για την αλλαγή του βαθμού αυτοϋδρόλυσης ή του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης από διάφορους παράγοντες που μελετήθηκαν μια μονάδα. Έτσι η αναπτυσσόμενη εξίσωση αποκτά νέες μαθηματικές αναλύσεις, έννοιες, συμπεράσματα και εφαρμογές όπως στην παρασκευή σιτηρεσίων και φαρμάκων (GraphPad Prism 5, 2010).

Η χρήση της εξίσωσης από τους διάφορους ερευνητές δεν απαιτεί την γνώση όλων των μεταβλητών παραμέτρων καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί η κάθε τάξη μεμονωμένα ή σε

ομάδες ανάλλαγα με την επιθυμία που έχει ο ερευνητής. Οι μη γραμμικές εξισώσεις έχουν την δυνατότητα να περιγράψουν σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία πέψης ως βιοχημικές αντιδράσεις στους ιχθύς σε πολύ καλύτερο βαθμό από τις γραμμικές (GraphPad Prism 5, 2010).

Παράμετρος 1: επίδραση της αναλογίας συγκέντρωσης του σιτηρεσίου CB (ως υπόστρωμα) ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Μελετώντας την επίδραση των διαφόρων περιβαλλοντολογικών και βιολογικών παραγόντων, για το στήσιμο της μεθόδου στο προσδιορισμό των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων και την ανάπτυξη της εξίσωσης για την πρόβλεψη του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης (DH), ερευνήθηκε η βιολογική μεταβλητή παράμετρος της αναλογίας συγκέντρωσης σιτηρεσίου ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (S/E).

Αναλογίες S/E, οι οποίες κυμαίνονται από 5 g / kg, 10 g / kg (Choubert et al., 1988; Eshel Ariel et al., 1993) έως 40 g / kg ακόμα και 100 g / kg (Mutilangi et al., 1995; Baek & Cadwallader, 1995), έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησαν εμπορική πηγή ενζύμων, με αποτέλεσμα μια σταθερή δράση στην υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων. Όταν όμως εκφράστηκαν οι αναλογίες με συγκέντρωση σιτηρεσίου (πρωτεϊνικό υπόστρωμα) mg ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας και αντίστροφα (Alarcon et al., 2002), τα αποτελέσματα έδειξαν μεταβλητή δράση της υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων. Αυτός ο τρόπος, έκφρασης των αναλογιών, ήταν αποτελεσματικότερος για την κατανόηση της επίδρασης της συγκέντρωσης της διατροφικής πρωτεΐνης στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης.

Η χρήση ενζύμων από αποσπάσματα πεπτικού συστήματος των πειραματικών ιχθύων έχουν ως αποτέλεσμα την καλύτερη υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών και την προσομοίωση της διαδικασίας πέψης σε αυτούς τους πειραματικούς ιχθύς για την κατανόησή της και για το στήσιμο της μεθόδου *in vitro* σχετικά με χρήση άλλων πηγών ενζύμων.

Για αυτό σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εκφράσεις των αναλογιών συγκεντρώσεων σιτηρεσίου mg ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας και η χρήση ενζύμων από αποσπάσματα πεπτικού συστήματος λαβρακιού.

Τα στατιστικά αποτελέσματα των πειραματικών δεδομένων των βαθμών αυτοϋδρόλύσεων (Πίνακας 2.3.), (Εικόνα 2.4.) και των βαθμών ενζυμικών υδρόλύσεων (Πίνακας 2.10.), (Εικόνα 2.7.) απέδειξαν πως ο βαθμός αυτοϋδρόλυσης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου και ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας. Από την σύγκριση των βαθμών αυτών σε ζεύγη διαφορετικών συγκεντρώσεων σιτηρεσίου, χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD, παρατηρείται ότι ο ρυθμός της επίδρασης της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου στο βαθμό αυτών μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης (Πίνακας 2.3), (Πίνακας 2.10). Έτσι στα μικρά σημεία συγκεντρώσεων σιτηρεσίου είχαμε μεγαλύτερους βαθμούς από ότι στα σημεία μεγάλων συγκεντρώσεων.

Οι περισσότεροι ερευνητές έχουν αναπτύξει εξίσωση γραμμικής συσχέτισης χρησιμοποιώντας ένζυμα εκφραζόμενα σε g / kg (Diniz & Martin, 1996 & 1997) και mg / U, η οποία όμως θεωρείται ότι δεν αποδίδει θετικά προβλέψιμα αποτελέσματα βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλησης.

Σε αυτήν την μελέτη αναπτύχθηκαν μη γραμμικές εξισώσεις όπως Two phase exponential decay για τα πειραματικά δεδομένα αυτοϋδρόλυσεων και για τα πειραματικά δεδομένα ενζυμικής υδρόλυσης, η οποία είχε θετικά προβλέψιμα αποτελέσματα των πειραματικών δεδομένων (Εικόνα 2.11), (Εικόνα 2.15) στην εξέταση επαλήθευσης της εξίσωσης και στην εξέταση της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων. Οι παραπάνω αναπτυγμένες εξισώσεις είναι συγγενικές με τη μη γραμμική εξίσωση του Michaelis Menten, στην οποία η ταχύτητα της κατάλυσης v μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος s .

Η συγκέντρωση του σιτηρεσίου CB ήταν ο καθοριστικός παράγοντας, ο οποίος προσδιόρισε το είδος και την ανάπτυξη της εξίσωσης, η οποία προσαρμόστηκε στην συνέχεια με την προσθήκη κατάλληλων εξισώσεων των υπολοίπων παραγόντων.

Η επίδραση του παράγοντα της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου είναι ο πρώτος σημαντικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει περισσότερο το βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 2.20.), γεγονός, το οποίο παίζει μεγάλο ρόλο στη διαμόρφωση του βαθμού αυτοϋδρόλυσης.

Οι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης DH χρησιμοποιούνται ως δείκτες της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης και έχουν τη δυνατότητα να αντιπροσωπεύουν το ποσοστό πεπτικότητας κατά τη διαδικασία πέψης των πρωτεϊνών *in vivo*.

Το λαβράκι κατά τη λήψη (σε κάθε γεύμα) ενός ποσού σιτηρεσίου, παράγει μια ποσότητα ολικών αλκαλικών πρωτεασών. Η αναμενόμενη τελική αναλογία S / E που μπορεί να φτάσει στο έντερο είναι κοντά στα 500 μ g πρωτεΐνης ανά μονάδα δραστηριότητα ολικών αλκαλικών πρωτεάσεων (Alarcon et al., 2002).

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες σιτηρεσίου ανά μονάδα δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών, ώστε να συμπεριλάβει όλες τις πιθανές αναλογίες S / E, οι οποίες μπορεί να προκύψουν στο έντερο του λαβρακιού.

Οι αναλογίες αυτές βρίσκονται στα διάφορα σημεία της αναπτυσσόμενης εξίσωσης, όπου οι διακυμάνσεις του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης επηρεάζονται κυρίως από την ποιότητα και την ποσότητα της διατροφικής πρωτεΐνης (Johnston & Coon, 1979).

Ο Alarcon et al. (2002) είναι από τους πρώτους που χρησιμοποίησε την αναλογία S/E στο pH-stat, με οχτώ σημεία συγκέντρωσης σιτηρεσίου στα ψάρια.

Σε αυτήν την μελέτη χρησιμοποιούνται εννέα διαφορετικές αναλογίες S/E με σκοπό την ακριβή προβλεψιμότητα της αναπτυσσόμενης εξίσωσης του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης της κάθε αναλογίας του σιτηρεσίου στο έντερο.

Οι πιθανοί λόγοι της μείωσης των βαθών ενζυμικής υδρόλυσης και των βαθμών αυτοϋδρόλυσης κατά την εκάστοτε αύξηση της ποσότητας του σιτηρεσίου ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας, είναι η εξάντληση του υποστρώματος και η παρεμπόδιση παραγωγής τελικών προϊόντων κατά την αντίδραση (Alarcon et al., 1998) & (Torrissen, 1984). Η απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας των προστιθέμενων ενζύμων δεν μπορεί να είναι η κύρια αιτία αυτής της μείωσης, επειδή το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει κατά την αυτοϋδρόλυση και επειδή δεν έχουν καταγραφεί απώλειες ενζυμικής δραστηριότητας για αυτά τα επίπεδα pH και για το χρόνο της κάθε αντίδρασης (Alarcon et al., 1998). Οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος ήταν τέτοιες που θα ήταν αδύνατο να προκαλέσουν την εξάντληση του υποστρώματος. Αυτή η μείωση του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης οφείλεται σε παρεμπόδιση τελικών προϊόντων από αναστολείς (Adler-Nissen, 1986) & (Alarcon et al., 2002). Η αποδόμηση των πρωτεϊνών και ο ρυθμός υδρόλυσης του υποστρώματος πιθανόν να επηρεάζεται από τη συσσώρευση μη πεπτομένων υπολειμμάτων σιτηρεσίων και προϊόντων της αντίδρασης, τα οποία παρεμποδίζουν την ενζυμική υδρόλυση (Savoie, 1994).

Παράμετρος 2: επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Οι διακυμάνσεις του pH μελετήθηκαν σε τρία τμήματα εντέρου της τσιπούρας (Deguara et al., 2003) κατά τη διάρκεια 12 ωρών ακολουθώντας τη ροή του σιτηρεσίου κατά μήκος του εντέρου. Με την είσοδο του όξινου πεπτούμενου σιτηρεσίου στο πρόσθιο έντερο, το pH του εντέρου μειώθηκε ελαφρώς, και αμέσως μετά αυξήθηκε όταν διττανθρακικά ιόντα εκκρίθηκαν στην κοιλότητα του εντέρου. Η επίδραση αυτής της έκκρισης είναι εμφανής κατά τη ροή του πεπτούμενου σιτηρεσίου στο έντερο, καθώς αυξάνεται το pH από 6,8 στο πρόσθιο έντερο σε 7,9 στο οπίσθιο έντερο.

Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν από τους (Maier & Tullis, 1984) σε πείραμα στους ιχθύες *O. mossambicus*, όπου διαπιστώνεται επίσης ότι οι αλλαγές του επιπέδου pH στο πεπτικό σύστημα των ιχθύων επηρεάζεται και από το είδος του σιτηρεσίου, την ηλικία τους, το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η πέψη, τη θερμοκρασία, την αλατότητα, τη φωτοπερίοδο, το στρες και το περιβάλλον εκτροφής των ιχθύων.

Βέβαια σε *in vitro* πειράματα χρησιμοποιώντας το σύστημα pH-stat για τη μέτρηση της ενζυμικής υδρόλυσης της διατροφικής πρωτεΐνης, αυτοί οι παράγοντες κατά την υδρόλυση είναι σταθεροί και ελεγχόμενοι.

Από το πείραμα του (Deguara et al., 2003) για την πέψη στην τσιπούρα προέκυψε ότι το pH στο πρόσθιο έντερο κυμαίνεται από 6,5 έως 7,1, στο μέσο έντερο να κυμαίνεται από 7,1 έως 7,7 και στο οπίσθιο έντερο 6,9 έως 7,9.

Από το πείραμα των (Alliot et al., 1974) για την πέψη στο λαβράκι προέκυψε ότι το επίπεδο pH στο έντερο κυμαίνεται από 7 έως 9.

Έτσι η εκάστοτε αλλαγή του επιπέδου pH στην αλκαλική πέψη έγινε με βάση τη διακύμανση του στο πεπτικό σύστημα των ιχθύων. Αυτό γίνεται λόγω της αλλαγής της ιοντικής κατάστασης των μορίων του υποστρώματος και των καταλοίπων των αμινοξέων του ενζύμου. Τα κατάλοιπα των αμινοξέων τα οποία ταξινομούνται σε όξινα και αλκαλικά έχουν την ικανότητα να δεχτούν ή να δώσουν ένα πρωτόνιο αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά τους και την έντασή τους, έως ότου φθάσουν στον ισοϊοντικό βαθμό pH.

Κάθε σημείο pH κατάλληλο για ένα ένζυμο μειώνει τη δραστηριότητα άλλων ενζύμων, πράγμα το οποίο επιφέρει αλλαγή στο ποσοστό πεπτικότητας της πρωτεΐνης των ιχθύων. Για τους παραπάνω λόγους αναπτύχθηκε αυτή η μέθοδος για την εκτίμηση της πεπτικότητας των σιτηρεσίων σε διάφορα επίπεδα pH.

Από τα στατιστικά αποτελέσματα των πειραματικών δεδομένων αυτοϋδρόλύσεων το επίπεδο pH δεν είχε καμία επίδραση στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης, πράγμα το οποίο μπορεί να οφείλεται στις διαφορές του αριθμού των παρατηρήσεων. Μόνο η αλληλεπίδραση του

επιπέδου pH με τη συγκέντρωση σιτηρεσίου έδωσε στατιστικές διαφορές στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 2.4.), (Εικόνα 2.4.).

Με τη σύγκριση ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD, υπήρχαν σε όλους τους συνδυασμούς στατιστικές διαφορές (Πίνακας 2.5.).

Η επίδραση του παράγοντα του επιπέδου pH είναι ο δεύτερος σημαντικός κατά σειρά παράγοντας ο οποίος επηρεάζει περισσότερο το βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 2.20.), γεγονός το οποίο παίζει μεγάλο ρόλο στη διαμόρφωση του βαθμού αυτοϋδρόλυσης.

Η ανάπτυξη της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλύσεων η οποία βασίστηκε στις τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NpH απέδειξε ότι, με την εκάστοτε μείωση του pH του μείγματος από pH 8 σε pH 7 και σε pH 6, μειώνεται η τιμή της μεταβλητής παραμέτρου και οι βαθμοί αυτοϋδρόλύσεων των διατροφικών πρωτεϊνών (Πίνακας 2.17.), (Εικόνα 2.15.).

Στην ενζυμική υδρόλυση η στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων απέδειξε ότι υπήρχαν διαφορές των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης από την επίδραση του παράγοντα του επιπέδου pH και από την αλληλεπίδραση του με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου (Πίνακας 2.21.), (Εικόνα 2.16.).

Η χρησιμοποίηση του κριτηρίου LSD απέδειξε ότι δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης, μεταξύ του επιπέδου pH 8 και pH 7, ενώ οι πολύ χαμηλοί βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης του επιπέδου pH6 διέφεραν σε όλα τα επίπεδα σημαντικότητας από τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης των άλλων επιπέδων pH (Πίνακας 2.12.).

Η ανάπτυξη της εξίσωσης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης, η οποία βασίστηκε στις τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NpH , απέδειξε ότι με τη μείωση του επιπέδου pH μειωνόταν η τιμή της μεταβλητής παραμέτρου και οι βαθμοί της ενζυμικής υδρόλυσης. Παρατηρείται ότι η μείωση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου NpH στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης από το επίπεδο pH 7 στο pH 6 ήταν μεγαλύτερη πάνω από 12 φορές από αυτήν του επιπέδου pH8 σε pH 7 (Πίνακας 2.21), (Εικόνα 2.16). Ο παράγοντας του επιπέδου pH είναι ο δεύτερος παράγοντας κατά σειρά που επηρεάζει το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης (Πίνακας 2.26) περισσότερο και από το βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 2.27).

Η υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των πρωτεϊνών και την απελευθέρωση των φορτισμένων με αρνητικό φορτίο πεπτιδικών δεσμών, οι οποίοι μειώνουν το επίπεδο pH στο εξεταζόμενο μείγμα. Το σύστημα pH-stat διατηρεί σταθερό το επίπεδο pH στο επιθυμητό επίπεδο, titλοδοτώντας NaOH στο εξεταζόμενο μείγμα. Η δυνατότητα του συστήματος για τη διατήρηση του επιπέδου pH σε χαμηλά επιθυμητά επίπεδα είναι μεγαλύτερη επειδή χρειάζεται λιγότερη ποσότητα καυστικού νατρίου από αυτήν στα μεγαλύτερα επίπεδα pH. Με την αύξηση της ποσότητας του σιτηρεσίου στο εξεταζόμενο μείγμα, ο ρυθμός της προσθήκης του καυστικού νατρίου δεν επαρκεί για την διατήρηση του επιπέδου pH σταθερό στο επιθυμητό επίπεδο εξαιτίας της αύξησης των φορτισμένων με αρνητικό φορτίο πεπτιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα τη

μείωση του επιπέδου pH του μείγματος από το επιθυμητό επίπεδο. Αυτή η χημική διεργασία γίνεται έντονα διακριτή κατά τον προσδιορισμό του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης στο επίπεδο pH 6, σε σημείο που εμπόδιζε τον υπολογισμό των βαθμών τους σε μεγαλύτερες από 1,5 μg / u συγκεντρώσεις διατροφικής πρωτεΐνης. Η διατήρηση του επιπέδου pH του εξεταζόμενου μείγματος σε pH 6 απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα καυστικού νατρίου από ότι απαιτεί σε pH 7 σε pH 8 αντίστοιχα. Η επίδραση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης και στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης μειώνεται από το επίπεδο pH 8 σε pH 7 και σε pH 6 αντίστοιχα.

Στη βιομηχανία τροφίμων έχει μελετηθεί η επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης. Οι (Baek & Cadwallader, 1995) για τη μελέτη της ενζυμικής υδρόλυσης επεξεργασμένης καραβίδας *in vitro* άλλαξαν το επίπεδο pH από pH 7 έως και pH 11 χρησιμοποιώντας εμπορικά ένζυμα. Ερευνητές για την μελέτη *in vitro* της επίδρασης του επιπέδου pH στην ενζυμική υδρόλυση του μυός του σκυλόψαρου (Diniz & Martin, 1996 & 1997) άλλαξαν το επίπεδο pH από pH 7 σε pH 8 και σε pH 9.

Το διάστημα καταλληλότητας επιπέδου pH για τη μέγιστη δραστηριότητα των αλκαλικών πρωτεασών είναι μεταξύ pH 7 έως και pH 10 στην τσιπούρα *Sparus aurata* και τον *Dentex dentex* (Alarcon et al., 1998). Σε άλλη μελέτη το διάστημα καταλληλότητας για τη μέγιστη πρωτεολυτική δραστηριότητα αποσπασμάτων εντέρου ήταν από pH 9,5 έως και pH 10 σε *Sebastes mentella*, *Sparus aurata*, *Scophthalmus maximus* (Munilla-Mordn & Saborido-Rey, 1996). Στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) το εκτρεφόμενο σε γλυκό νερό και στο *Morone chrysops* * *M. Saxatilis* το διάστημα καταλληλότητας για τη μέγιστη δραστηριότητα των αλκαλικών πρωτεασών ήταν από pH 9 έως και pH 10 (Eshel et al., 1993).

Από όλες αυτές τις δημοσιευμένες μελέτες συμπεραίνουμε ότι το επίπεδο pH 8 είναι το καταλληλότερο για την απόδοση μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη μέγιστη ενζυμική υδρόλυση και τους καλύτερους βαθμούς ενζυμικών υδρόλύσεων των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων.

Παράμετρος 3: επίδραση της θερμοκρασίας στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Στο λαβράκι, επειδή είναι ψυχρόαιμος ιχθύς, η θερμοκρασία του ύδατος στο οποίο ζει διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στην φυσιολογία πέψης όσο και στην διαδικασία πέψης της διατροφικής πρωτεΐνης, καθώς όλες οι διάφορες διεργασίες πέψης γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Έτσι προσαρμόστηκε το σύστημα pH-stat, για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης και αυτουδρόλυσης του σιτηρεσίου με ένζυμα αποσπασμάτων λαβρακιού, σε μεσογειακά επίπεδα θερμοκρασίας, με εκάστοτε αύξηση της θερμοκρασίας από 15 °C σε 20 °C σε 25 °C στο εξεταζόμενο μείγμα με την βοήθεια του υδατόλουτρου (Εικόνα 2.1.).

Τα αποτελέσματα απέδειξαν πως η εκάστοτε αύξηση της θερμοκρασίας δεν επηρεάζει το βαθμό αυτουδρόλυσης στατιστικά (Πίνακας 2.6 & 2.7.), (Εικόνα 2.5.) και οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NT είχαν μικρό εύρος (Πίνακας 2.18), (Εικόνα 2.13). Η θερμοκρασία βρίσκεται στην τέταρτη και τελευταία σειρά παραγόντων που επηρεάζουν περισσότερο τον βαθμό αυτουδρόλυσης (Πίνακας 2.20.). Στην ενζυμική υδρόλυση, με την εκάστοτε αύξηση της θερμοκρασίας του εξεταζόμενου μείγματος, αυξάνονταν οι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης σε σχέση με την αυτουδρόλυση χωρίς καμία στατιστική διαφορά (Πίνακας 2.13 & 2.14), (Εικόνα 2.9) όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας σε αυτούς. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NT στην ενζυμική υδρόλυση, είχαν μεγαλύτερο εύρος από ότι στην αυτουδρόλυση (Πίνακας 2.27), αν και κατατάσσεται πέμπτη και προτελευταία στην σειρά των παραγόντων που επηρεάζουν περισσότερο τον βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης (Πίνακας 2.26), αποδεικνύοντας ότι διαδραματίζει μικρότερο σχετικά ρόλο από άλλους παράγοντες (Πίνακας 2.22), (Εικόνα 2.17). Το εύρος αυτό της μεταβλητής παραμέτρου της θερμοκρασίας είναι μικρό για την ύπαρξη στατιστικής διαφοράς δηλαδή για την διαφοροποίηση των αριθμών των διασπώμενων πεπτιδικών δεσμών των διατροφικών πρωτεϊνών στις διάφορες θερμοκρασίες, είτε στο βαθμό αυτουδρόλυσης είτε στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης.

Σε πείραμα για την εξέταση της επίδρασης της θερμοκρασίας στον βαθμό της ενζυμικής υδρόλυσης της πρωτεΐνη οξυρύγχου, χρησιμοποιήθηκαν θερμοκρασίες της τάξης 35 °C, 45°C και 55 °C, για την καταλληλότητα αυτής της πρωτεΐνης στην βιομηχανία τροφίμων (Ovissipour et al., 2009). Για το ίδιο λόγο με την χρήση του pH-stat (Diniz & Martin, 1996 & 1997) έγινε μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στον βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης της πρωτεΐνης σκυλόψαρου κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν θερμοκρασίες της τάξης των 40 °C, 50 °C και 60 °C. Για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενζυμική

υδρόλυση της πρωτεΐνης της γαρίδας (Baek & Cadwallader, 1995) χρησιμοποιήθηκαν θερμοκρασίες της τάξης από 60 °C έως 80 °C.

Σε αυτές τις τρεις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν θερμοκρασίες επεξεργασίας τροφίμων για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας της μέγιστης δραστηριότητας των ενζύμων εμπορίου κατά την υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών με σκοπό την εφαρμογή τους στην βιομηχανία τροφίμων. Ενώ αυτή η μελέτη για πρώτη φορά χρησιμοποιεί διάφορες μεσογειακές θερμοκρασίες για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας της μέγιστης δραστηριότητας των ενζύμων από αποσπάσματα πεπτικού συστήματος ιχθύων κατά την ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών, με σκοπό την προσομοίωση της διαδικασίας πέψης των μεσογειακών ιχθύων *in vitro* και την αξιολόγηση των σιτηρεσίων τους.

Το καταλληλότερο διάστημα θερμοκρασίας για τα πεπτικά ένζυμα ολικών πρωτεασών από τα πυλωρικά τυφλά διερευνήθηκαν στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) και *Dentex dentex* (Alarcon et al., 1998), τα οποία χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητα στην αλλαγή της θερμοκρασίας σε σύγκριση με τα ένζυμα ολικών όξινων πρωτεασών, διατηρώντας λιγότερα από το 40 % της δραστηριότητας τους μετά από επώαση σε θερμοκρασία 50 °C. Η δραστηριότητα της χυμοθρεψίνης μειώνεται 25 % στους 40 °C. Η θρυψίνη σε αυτή την θερμοκρασία είναι πλήρως ενεργή και μειώνεται η δραστηριότητά της 10% στους 60°C. Η κατάλληλη θερμοκρασία για την μέγιστη δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών σε αυτούς τους ιχθύες είναι 50 °C έως 55 °C.

Στον σολομό (*Salmo salar*) και την πέστροφα (*Salmo gairdneri*) (Torrissen, 1984), τα ένζυμα των οποίων έδειξαν παρόμοια χαρακτηριστικά ως προς την ευαισθησία τους στον βαθμό θερμοκρασίας, η καταλληλότερη θερμοκρασία για τις ολικές αλκαλικές πεοτεάσες από πυλωρικά τυφλά ήταν 52,5°C και για τους δύο ιχθύς.

Μελέτη για τα χαρακτηριστικά των διαφόρων πρωτεασών ενζύμων λαβρακιού ως προς τη θερμοκρασία δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα.

Σε πειράματα *in vivo*, για την επίδραση της θερμοκρασίας του ύδατος σε βιολογικούς παραμέτρους των ιχθυδίων λαβρακιού, ο ρυθμός ανάπτυξης των ιχθυδίων και η αποδοτικότητα του σιτηρεσίου βελτιώθηκαν σημαντικά (Peres & Oliva-Teles, 1999) στους 25 °C σε σχέση με τους 18 °C κατά την παροχή σιτηρεσίων διαφορετικών επιπέδων πρωτεΐνης. Αυτό αποδείχθηκε ότι ήταν αποτέλεσμα της αύξησης της αναλογίας της πρόσληψης του σιτηρεσίου για την ανάπτυξη, όταν η θερμοκρασία πλησιάζει την βέλτιστη θερμοκρασία για το λαβράκι. Η θερμοκρασία επιδρά περισσότερο στην αύξηση του βάρους από ότι επιδρά στην συντήρηση.

Σε άλλο πείραμα (Alliot et al., 1983) για την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη, στην αποδοτικότητα του σιτηρεσίου και την σύνθεση του σώματος στο λαβράκι, χρησιμοποιήθηκαν θερμοκρασίες 15 °C και 22 °C και αλατότητα 6 ‰, 11 ‰, 24 ‰, 37 ‰. Τα

αποτελέσματα απέδειξαν ότι σε θερμοκρασία 15 °C γρηγορότερη ανάπτυξη των ιχθύων ήταν σε αλατότητα 11‰, 24‰. Εκεί που υπήρχαν τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν σε θερμοκρασία 22 °C όπου οι ιχθύες αναπτύσσονταν γρηγορότερα, ειδικά όταν η αλατότητα ήταν 6 ‰ και 37 ‰. Αυτό αποδεικνύει την ευαισθησία του λαβρακιού στην θερμοκρασία και την αλατότητα.

Στο πείραμα των Person-Le Ruyet et al., (2004) για την επίδραση της θερμοκρασίας 13 °C, 16 °C, 19 °C, 22 °C, 25 °C και 29 °C σε Μεσογειακό πληθυσμό λαβρακιών, η αύξηση του βάρους ήταν μεγαλύτερη, ο ρυθμός ανάπτυξης γρηγορότερος και η πρόσληψη του σιτηρεσίου περισσότερη με την εκάστοτε αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης διαπιστώθηκε ότι βελτιώνεται και η αποδοτικότητα του σιτηρεσίου.

Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να συνδυαστούν με την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, η οποία αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα την καλύτερη αξιοποίηση του σιτηρεσίου για την αύξηση του βάρους, την ανάπτυξη και γενικά την ζωτικότητα των ιχθύων.

Σε τρία διαφορετικά είδη επεξεργασίας σιτηρεσίου (Sato et al., 2000) νωπό, ξηρό και υγρό, μετρήθηκε ο συντελεστής πεπτικότητας σε νεαρά άτομα *Seriola quinqueradiata*, σε όλες τις εποχές του έτους. Ο φαινομενικός συντελεστής πεπτικότητας της πρωτεΐνης ήταν 85 % στο υγρό σιτηρέσιο άσχετα με τις εποχικές θερμοκρασίες, ενώ στα δύο άλλα είδη επεξεργασίας σιτηρεσίου ήταν 60 % έως 80 % το χειμώνα και 80 % έως 90 % το καλοκαίρι.

Σε θερμοκρασία 7 °C και 11 °C σε ιχθύες (*Salvelinus alpinus*) (Gudmundsson & Petursdottir, 1998), η επίδραση της θερμοκρασίας στην πεπτικότητα της πρωτεΐνης ήταν περιορισμένη με καλύτερες τιμές σε θερμοκρασία 11 °C χωρίς στατιστικές διαφορές ανεξάρτητα από το είδος του σιτηρεσίου.

Συμπεραίνουμε από αυτά τα αποτελέσματα πως η θερμοκρασία επιδρά ανάλογα με το είδος επεξεργασίας του σιτηρεσίου, το είδος του σιτηρεσίου και το είδος του ιχθύος στο συντελεστή πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης.

Σε πείραμα του Jeong Dae Kim (Kim et al., 1998) για την επίδραση της θερμοκρασίας 18 °C και 25 °C στο φαινομενικό συντελεστή πεπτικότητας της πρωτεΐνης του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*), με δύο σιτηρέσια φυτικής πρωτεϊνικής πηγής (σόγια) και ζωικής πρωτεϊνικής πηγής (ρέγκα), ο φαινομενικός συντελεστής πεπτικότητας της πρωτεΐνης διαπιστώθηκε ότι ήταν μεγαλύτερος σε θερμοκρασία 25 °C και για τα δύο σιτηρέσια με στατιστικές διαφορές.

Σε *in vivo* πείραμα για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας 18 °C και 25 °C στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης σε ιχθύδια λαβρακιού δεν υπήρξε καμία επίδραση (Moreira et al., 2007).

Όλα, αυτά τα παραπάνω διαφοροποιημένα μεταξύ τους αποτελέσματα μελετών *in vivo*, ενισχύουν την ανάγκη για τη μέτρηση της πεπτικότητας *in vitro* η οποία υδρολύει τη

διατροφική πρωτεΐνη υπό ελεγχόμενες συνθήκες και ποσοτικοποιεί τον αριθμό των διασπώμενων πεπτιδίων της πρωτεΐνης.

Μελέτες μέτρησης *in vitro* πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης γίνονταν σε θερμοκρασία 37 °C (Alarcon et al., 2002) (θερμοκρασία ανθρώπου), η οποία δεν ισχύει για μεσογειακά είδη ιχθύων.

Ολοκληρώνοντας η θετική επίδραση, της εκάστοτε αύξησης της θερμοκρασίας στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το σύστημα pH-stat, εξηγείται με την ιδιότητα την οποία έχει η θερμοκρασία στην ανάλυση και την αποδόμηση των οργανικών ουσιών κατά τη διάρκεια των βιολογικών αντιδράσεων (Desrosiers et al., 1987).

Παράμετρος 4: επίδραση της αλατότητας στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών.

Δεν έχουν γίνει μέχρι σήμερα πειράματα με την μέθοδο του pH-stat για τη μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης σε κανένα είδος ιχθύος. Η προσαρμογή της μεθόδου με προσθήκη αλάτων εξαιτίας του ότι, οι ιχθύες του θαλασσινού νερού όπως τελεόστεοι (Marshall & Grosell, 2005), λάμπραινα (Rankin, et al., 2001) και εγκλιματισμένος οξύρυγχος σε θαλασσινό νερό (Rodriguez et al., 2002), πίνουν νερό με ρυθμό 2ml έως 5ml ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ώρα, όπου η απορρόφηση του νερού κυμαίνεται από 60 % έως 85 % στο έντερο (Smith, 1930), (Shehadeh & Gordon, 1969), (Sleet & Weber, 1982) , με ρυθμό 2μl έως 6μl ανά cm μήκους εντέρου ανά ώρα (Grosell & Jensen, 1999), (Grosell et al., 2001 & 2005), με αποτέλεσμα να είναι μικρότερη η συγκέντρωση των αλάτων στους ιχθύες από αυτήν του θαλασσινού νερού. Παράλληλα η απορρόφηση των ιόντων Na^+ , Cl^- και K^+ γίνεται σε ποσοστό 98 %, 96 % και 75 % αντίστοιχα στο γαστροεντερικό τμήμα. Η συγκέντρωση άλλων ιόντων στα υγρά του εντέρου είναι μεγαλύτερη από αυτή του θαλασσινού νερού, όπου τα ιόντα Mg^{+2} , SO_4^{-2} , των οποίων οι συγκεντρώσεις φτάνουν στα υγρά του εντέρου σε πλαίσια > των 100 Mm συγκριτικά με το θαλασσινό νερό, στο οποίο φτάνουν σε πλαίσια 50mM και 30mM, ενώ η συγκέντρωση Ca^{+2} στα υγρά του εντέρου είναι μικρή (Smith, 1930), (Grosell et al., 2001). Το λαβράκι είναι ευρύαλος ιχθύς, ο οποίος έχει βέλτιστη ανάπτυξη σε διάφορα επίπεδα αλατότητας.

Για την κατανόηση της επίδρασης της αλατότητας στη δραστικότητα των διαφόρων πρωτεασών ενζύμων *in vitro* και *in vivo* και στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης *in vivo* στο λαβράκι, το οποίο θεωρείται ευρύαλο είδος ιχθύος, θα επικεντρωθεί η συζήτηση σε πειράματα *in vivo* και *in vitro*, της φυσιολογικής κατάστασης των ιχθύων σε διάφορα ποσοστά αλατότητας και της υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης κατά την αντίδραση σε διάφορα ποσοστά αλατότητας.

Τα στατιστικά αποτελέσματα (Πίνακας 2.8 & 2.9.), (Εικόνα 2.6.) και οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NS (Πίνακας 2.19.), (Εικόνα 2.14.) σε αυτό το πείραμα απέδειξαν, ότι η αύξηση της αλατότητας μείωσε τον βαθμό αυτοϋδρόλύσεων και οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NS μειώνονταν με την αύξηση της αλατότητας κατά την ανάπτυξη της εξίσωσης. Ήταν ο τρίτος παράγοντας κατά σειρά ο οποίος επηρέασε το βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 2.20.), και τέταρτος κατά σειρά ο οποίος επηρέασε το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης (Πίνακας 2.26.), αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι επηρέασε τον βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 2.27.).

Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NS (Πίνακας 2.23.), (Εικόνα 2.18.) και οι βαθμοί της ενζυμικής υδρόλυσης μειώνονταν με την αύξηση της αλατότητας (Πίνακας 2.15 & 2.16.), (Εικόνα 2.10.). Τα παραπάνω αποδεικνύουν τη σημασία της κατακράτησης των αλάτων

στον οισοφάγο των ιχθύων, η οποία γίνεται για να μειωθεί η επίδραση της αυξημένης αλατότητας κατά την υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών στο γαστροεντερικό τμήμα του λαβρακιού.

Η μείωση των βαθμών αυτοϋδρολύσεων με την αύξηση της αλατότητας εξηγείται με τον κορεσμό του εξεταζόμενου διαλύματος σε συγκέντρωση ιόντων των αλάτων, ο οποίος αυξάνει την πυκνότητα του και μειώνει την ικανότητα του ως διαλύτης.

Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι ένας από τους παράγοντες οι οποίοι πραγματοποιούν αντιστρεπτές μοριακές αλληλεπιδράσεις στα βιολογικά συστήματα. Έτσι τα διάφορα ιόντα των αλάτων διαμορφώνουν ένα ηλεκτρικό πεδίο δεσμεύοντας το φορτισμένο καρβοξυλικό άκρο των πεπτιδικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα να μετακινηθεί και να κατευθυνθεί αυτό το καρβοξυλικό άκρο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρικό πεδίο το οποίο έχουν σχηματίσει τα διάφορα ιόντα των προστιθέμενων αλάτων. Η ικανότητα των ιόντων (OH^-), της χρησιμοποιημένης βάσης, να μεταβάλλουν το βαθμό του pH κατά την εξέταση, μειώνεται επειδή δεσμεύονται από τα ιόντα των προστιθέμενων αλάτων. Τα ιόντα των προστιθέμενων αλάτων έχουν μεγαλύτερη ιοντική δύναμη λόγω της συγκέντρωσή τους στο εξεταζόμενο διάλυμα από αυτά των πεπτιδίων των πρωτεϊνών και της βάσης. Η κάθε πρωτεΐνη συμπεριφέρεται διαφορετικά, ανάλογα με το κάθε άλας στο εξεταζόμενο διάλυμα, ως προς την διαλυτότητα (Sousa de Cássia S. et al., 2006). Γενικά, κατά την προσθήκη αλάτων, τα απλά ιόντα αλάτων δεσμεύονται με τις πρωτεΐνες και συσφίγγονται τα μόρια των πρωτεϊνών όταν αυτά είναι χαλαρά πριν από την προσθήκη ιόντων. Αυτή η διαδικασία θεωρείται μια συνταγή για την προστασία των πρωτεϊνών σύμφωνα με τον (Lovrien et al., 1994) Protein-Solvent Interactions.

Σε πειράματα *in vivo* η πεπτικότητα του ιχθυαλείου σε ιχθύες του είδους *chanos chanos* (Ferraris et al., 1986), ήταν μικρότερη σε ιχθύες που εκτρέφονταν σε θαλασσινό νερό. Αιτία αυτής της μείωσης ήταν η ταχύτερη κίνηση του ιχθυαλείου στο έντερο, η οποία οφείλεται στο ότι οι ιχθύες του θαλασσινού νερού πίνουν νερό για την οσμωτική ρύθμιση. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου για την πλήρη πέψη και την απορρόφηση των διατροφικών συστατικών.

Οι De Silva & Perera (1984) σε πείραμα του σε ιχθύς *Sarotherodon niloticus* απέδειξαν ότι δεν υπήρχε επίδραση της αλατότητας στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, χωρίς όμως να αιτιάσει τα αποτελέσματά του. Αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του παρόντος πείραματος το οποίο αποδεικνύει την επίδραση της αλατότητας.

Πείραμα των Krogdahl Ashild et al. (2003) για την επίδραση της αλατότητας στην πεπτικότητα της πρωτεΐνης ιχθύων *Salmo salar* και *Oncorhynchus mykiss* και την αλληλεπίδραση της αλατότητας με το είδος του ιχθύος στην πεπτικότητα της πρωτεΐνης απέδειξαν μεγάλη επίδραση της αλατότητας. Οι δείκτες πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης σε γλυκό νερό ήταν μεγαλύτεροι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους δείκτες σε

θαλασσινό νερό. Ενώ για την αλληλεπίδραση της με το είδος του ιχθύος οι δείκτες διατροφικής πρωτεΐνης της πέστροφας ήταν μεγαλύτεροι χωρίς στατιστικές διαφορές σε σχέση με τον σολομό. Αιτία της επίδρασης της αλατότητας ήταν η αύξηση της κατακρατημένης πρωτεΐνης στο θαλασσινό νερό σε σύγκριση με το γλυκό νερό, λόγω της μείωσης του μεταβολισμού των αμινοξέων ο οποίος συνδέεται με τη μείωση των απαιτήσεων σε αμινοξέα.

Σε πείραμα των Nchez-Chisng et al. (1986) για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του NaCl στην πρωτεολυτική δραστικότητα της πεψίνης του *Oncorhynchus Keta* αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση του NaCl αύξησε τη δραστικότητα της πεψίνης. Αιτία ήταν η άριστη προσαρμογή αυτού του ενζύμου στις περιβαλλοντολογικές συνθήκες με υψηλή αλατότητα. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να ισχύουν και για τις αλκαλικές πρωτεάσες. Στο παραπάνω πείραμα χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό υπόστρωμα (χυμογλοβίνη) από αυτό της παρούσας μελέτης και δεν αναφέρεται στην αλληλεπίδραση της εκάστοτε αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος με αύξηση της αλατότητας στην πρωτεολυτική δραστικότητα της πεψίνης.

Σε πείραμα των Tsuzuki et al. (2007) και άλλων για τη μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στη δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων *In vivo*, στο *Centropomus parallelus* (ευρύαλο είδος), οι δραστικότητες των ολικών αλκαλικών πρωτεασών, ήταν μεγαλύτερες σε αλατότητα 15 ‰ από ότι σε αλατότητα 0 ‰ και 35 ‰. Αυτές οι ολικές αλκαλικές πρωτεάσες συνθέτονται από ανενεργές ζυμογόνες πρωτεάσες στα παγκρεατικά κύτταρα, ενεργοποιούνται από ειδική πρωτεόλυση και απελευθερώνονται στη εντερική κοιλότητα. Η αλλαγή της αλατότητας επιδρά είτε στην ενεργοποίηση των ζυμογόνων πρωτεασών χωριστά, δεδομένου ότι γίνεται έξω από τα κυτταρικά όρια στην εντερική κοιλότητα, είτε επιδρά στην αυτοενεργοποίηση της κάθε πρωτεΐνης. Η Tsuzuki αναφέρεται και στη μελέτη της Moutou και άλλων (Moutou et al., 2004) σε πείραμα για την επίδραση της αλατότητας 33 ‰ και 20 ‰ στη δραστικότητα των πρωτεασών στην τσιπούρα *Sparus aurata* L, όπου αποδείχθηκε, ότι η δραστικότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών και η δραστικότητα της χυμοθρυψίνης στο έντερο, ήταν μικρή σε αλατότητα 20 ‰, αντίθετα με την θρυψίνη όπου ήταν υψηλή σε αλατότητα 20 ‰.

Σε πείραμα των Psochiou et al. (2007) για την ανταπόκριση των πρωτεασών στην απότομη μείωση της αλατότητας, αποδείχθηκε η επίδραση αυτής της μείωσης τόσο στην δραστικότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι όσο και στη δραστικότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών (συμπεριλαμβανομένης της χυμοθρυψίνης και της θρυψίνης) στο αλκαλικό τμήμα του εντέρου.

Έτσι για την αποφυγή της επίδρασης της αλατότητας στη δραστικότητα των ενζύμων κατά την εκτροφή των ιχθύων, όπως απέδειξαν οι παραπάνω μελέτες, χρησιμοποιήθηκε 1 μονάδα

δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών σε διάφορες συγκεντρώσεις σιτηρεσίου CB στο εξεταζόμενο μείγμα σε αυτή την μελέτη.

Δεν ήταν δυνατό να μην αναφερθεί και η μελέτη του (Dendrinos & Thorpe, 1985) για την επίδραση της εκάστοτε μείωσης της αλατότητας στην ανάπτυξη και τη σύνθεση του σώματος του λαβρακιού, όπου ο ρυθμός αύξησης βάρους ήταν μεγαλύτερος σε αλατότητα κατά φθίνουσα σειρά 30 ‰, 25 ‰, 33 ‰, 20 ‰, 10 ‰, 5 ‰. Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας του σιτηρεσίου και της πρωτεΐνης ήταν μεγαλύτερος σε αλατότητα 25 ‰ και 35 ‰. Η πρόσληψη του σιτηρεσίου αυξήθηκε με την αύξηση του ποσοστού αλατότητας. Αυτά τα αποτελέσματα διαφέρουν από τα αποτελέσματα του (Rubio et al., 2005), οι οποίοι βρήκαν αύξηση του προσλαμβανόμενου σιτηρεσίου με τη μείωση της αλατότητας από 25‰ σε 7‰ και σε 0 ‰ στο λαβράκι και διαφοροποίηση στην επίδραση της αλατότητας στην επιλογή διατροφικών καψουλών.

Τέτοια αποτελέσματα δεν μπορεί να συσχετιστούν ή να συνδυαστούν άμεσα με την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, καθώς ο ρυθμός αύξηση βάρους, η πρόσληψη του σιτηρεσίου, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας,... επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων εκτός από την πέψη των πρωτεϊνών.

Παράμετρος 5: Επίδραση του ενζυμικού προφίλ στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Στο πείραμα των Dimes et al. (1994) για τη μελέτη της επίδρασης του διατροφικού ιστορικού στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης *in vitro*, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά σε εκτρεφόμενους σολομούς οι οποίοι σιτίστηκαν με διάφορα επίπεδα ιχθυάλευρου από ρέγκα, ενώ βρέθηκαν διαφορές σε ιχθύδια σολομού τα οποία σιτίστηκαν με ιχθυάλευρο από ρέγκα, ιχθυάλευρο από ρέγκα με 25 % σογιάλευρο και σογιάλευρο. Ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης της διατροφικής πρωτεΐνης ήταν μικρός σε ιχθύες οι οποίοι σιτίστηκαν με σογιάλευρο χρησιμοποιώντας ένζυμα από τα πυλωρικά τυφλά.

Στο παρόν πείραμα τα αποτελέσματα απέδειξαν, ότι ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης (DH) σε ιχθύες οι οποίοι σιτίστηκαν με σιτηρέσια διαφόρων ποσοστών χαρουπιού ήταν μεγαλύτερος από αυτόν σε ιχθύες οι οποίοι σιτίστηκαν με σιτηρέσια διαφόρων ποσοστών μπιζελιού και ρεβυθιού (Εικόνα 2.19.) και ότι υπήρξαν διαφορές στην τιμή της μεταβλητής παραμέτρου NE του κάθε εκχύλισματος ενζύμου από ιχθύες διαφορετικού διατροφικού ιστορικού. Ήταν ο τρίτος παράγοντας στη σειρά ο οποίος επηρεάζει το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης περισσότερο (Πίνακας 2.26.).

Η επίδραση του διατροφικού ιστορικού και του ιστορικού περιβάλλοντος εκτροφής των ιχθύων στην δραστικότητα των διαφόρων ενζύμων έχει μελετηθεί από ερευνητές. Στο πείραμα του (Hidalgo et al., 1999) για τη μελέτη της δραστικότητας των πεπτικών ενζύμων των ιχθύων διαφορετικών διατροφικών συνθηκών (*Sparus aurata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Tinca tinca*), αποδείχθηκε ότι η πέστροφα και ο κυπρίνος έχουν μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστικότητα από τους άλλους ιχθύες και ο *Anguilla anguilla* είχε τη μικρότερη πρωτεολυτική δραστικότητα. Οι παμφάγοι ιχθύες αποδείχθηκε ότι έχουν μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστικότητα από τους σαρκοφάγους ιχθύες. Στους σαρκοφάγους ιχθύες η μικρότερη πρωτεολυτική δραστικότητα βρέθηκε στην πέστροφα. Η αναλογία ολικών αμιλασών προς την ολική πρωτεολυτική δραστικότητα ήταν μεγαλύτερη σε παμφάγους ιχθύες, με τον κυπρίνο να έχει την μεγαλύτερη αναλογία και την πέστροφα την μικρότερη. Εξήγηση της αυξημένης πρωτεολυτικής δραστικότητας σε παμφάγους ιχθύες είναι το ότι οι φυτικές πρωτεΐνες πέπτονται δυσκολότερα, με αποτέλεσμα οι απαιτήσεις τους να είναι μικρότερες σε πρωτεΐνες από των σαρκοφάγων, των οποίων η προσλαμβανόμενη πρωτεΐνη είναι πιο διαθέσιμη. Η μικρή πρωτεολυτική δραστικότητα στην τσιπούρα οφείλεται στο ότι οι πρωτεάσες από το ήπαρ και το πάγκρεας εκκρίνονται μαζί με τη χολή.

Σε άλλο πείραμα (Sunde et al., 2004) για τη μελέτη της επίδρασης επεξεργασίας του σιτηρεσίου στη δραστικότητα των πρωτεασών σε σολομούς βάρους 0,150 kg και 2 kg, με χαμηλή και υψηλή ποιότητα σιτηρεσίου ($[\%SH/(SH + (S-S))]$), δεν υπήρξε διαφορά στο

συντελεστή αποδοτικότητας του σιτηρεσίου για 60 ημέρες μεταξύ των ιχθύων οι οποίοι σιτίστηκαν με χαμηλή ποιότητα από αυτούς οι οποίοι σιτίστηκαν υψηλή ποιότητα σιτηρεσίου. Υπήρξε διαφορά στο συντελεστή αποδοτικότητας του σιτηρεσίου μεταξύ των ιχθύων των 2 kg και των ιχθύων των 0,150 kg. Ο μεγαλύτερος συντελεστής αποδοτικότητας του σιτηρεσίου συνδυάστηκε με μεγάλη δραστικότητα της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης. Η δραστικότητα της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης μειωνόταν με την αύξηση της αναλογίας θρυψίνης προς χυμοθρυψίνη. Μικρότερη αναλογία θρυψίνης προς χυμοθρυψίνη παρατηρήθηκε σε ιχθύες και των δύο μεγεθών οι οποίοι σιτίστηκαν με σιτηρέσιο υψηλής ποιότητας για διάστημα 90 ημερών, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι είναι δυνατόν να επιτευχθεί μια πλήρης προσαρμογή του πεπτικού συστήματος των ιχθύων στα πειραματικά σιτηρέσια.

Ένα τρίτο παράδειγμα για την κατανόηση της επίδραση του διατροφικού ιστορικού στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης είναι το πείραμα σε σολομούς οι οποίοι συλλέχτηκαν από 4 διαφορετικά ποτάμια της Νορβηγίας. Διαπιστώθηκε ότι ακόμη και μετά από δύο ολόκληρα χρόνια εκτροφή τους στη θάλασσα, η δραστικότητα των ολικών αλκαλικών των πυλωρικών τυφλών, των ολικών αλκαλικών του έντερου και των πεπτικών ενζύμων του στομάχου εξακολουθούσε να επηρεάζεται από το ιστορικό διατροφής (Torrissen K. R. & Torrissen O. J., 1984).

Τα πεπτικά ένζυμα είναι πρωτεΐνες οι οποίες αυξάνουν το ρυθμό μιας αντίδρασης, με αποτέλεσμα να προσδιορίζουν το σκηνικό των χημικών μετασχηματισμών κατά τη διαδικασία της πέψης. Σταθεροποιούν την μεταβατική κατάσταση η οποία έχει υψηλή ελεύθερη ενέργεια από προϊόντα της πέψης και τα αντιδρώντα. Έτσι η αύξηση της δραστικότητας της κάθε πρωτεΐνης αυξάνει το βαθμό ενζυμικής υδρόλησης (DH) (Πίνακας 2.24).

Για τον προσδιορισμό *in vitro* του ποσοστού πεπτικότητας της πρωτεΐνης στον άνθρωπο (Hsu et al., 1977; Satterlee, 1979; Diniz Fabio et al., 1996 & 1997) χρησιμοποιούνται ένζυμα εμπορίου από θηλαστικά ζώα, τα οποία διαφέρουν στις λειτουργίες τους και τα χαρακτηριστικά τους από εκείνα των πρωτεασών των ιχθύων (Rust, 2002). Αυτά δεν θεωρούνται τα καταλληλότερα, για τη μέτρηση της πεπτικότητας της πρωτεΐνης για ιχθύες, λόγω των διαφορών στη φυσιολογία πέψης.

Από τα χαρακτηριστικά των ενζύμων των ιχθύων είναι και η σχετικά υψηλή καταλυτική δραστικότητα σε αντιδράσεις χαμηλών θερμοκρασιών, η σταθερότητα τους στο βαθμό pH και τη θερμοκρασία και η ευαισθησία σε αναστολείς σε αντίθεση με τα ένζυμα των θηλαστικών (Squires et al., 1986; Alarcon et al., 2002).

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμες πρωτεΐνάσες και πεπτιδάσες. Χρησιμοποιήθηκαν πολυένζυμα για τη μέτρηση της πεπτικότητας της διατροφικής

πρωτεΐνης από τον Hsu και άλλους, με τρία ένζυμα: θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και πεπτιδάσες (Hsu et al., 1977) και με τέσσερα ένζυμα: θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, αμινοπεπτιδάσες, πρωτεάσες για το *S. griseus* (Satterlee et al., 1979) και με διπλή φάση πέψης μια όξινη και μια αλκαλική. Όλες αυτές οι μέθοδοι έδωσαν καλά αποτελέσματα σε θερμόαιμα ζώα.

Η *In vivo* υδρόλυση των πρωτεϊνών των σιτηρεσίων είναι αποτέλεσμα πρωτεολυτική δράσης ένδω και έξω πρωτεασών. Η *in vitro* μέθοδος από ένα ευρύ φάσμα πρωτεασών μπορεί να αντανακλά καλύτερα τη διαδικασία υδρόλυσης *In vivo* (Alarcon et al., 2002). Η χρήση εμπορικών ενζύμων συμπεριλαμβάνει τρεις ή τέσσερις πρωτεάσες, ενώ τα εκχυλίσματα ενζύμων από αποσπάσματα πεπτικού συστήματος ιχθύων συμπεριλαμβάνουν αρκετές πρωτεάσες όπως η χυμοθρυψίνη, η θρυψίνη, η καρβοξυπεπτιδάση Α και Β και η αμινοπεπτιδάση (Alarcon et al., 1998). Έτσι η μέτρηση πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* απαιτεί τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ενζύμων κατά την αντίδραση. Σε μελέτη τα εμπορικά ένζυμα έδωσαν μικρότερους βαθμούς πεπτικότητας από τις πρωτεάσες των ιχθύων (Alarcon et al., 2002). Έχουν βρεθεί αισθητές διαφορές στην ευαισθησία των πρωτεασών των διαφορετικών ειδών ιχθύων σε αναστολείς των υποστρωμάτων (Moyano et al., 1999). Η χρήση ενζύμων από αποσπάσματα πεπτικού συστήματος ιχθύων είναι μια καλή λύση για την ανάπτυξη της μεθόδου pH-stat στους ιχθύες (Dimes & Haard, 1994), (Kakade, 1974), (Löwgren et al., 1989).

Σε μελέτη (Alliot et al., 1974), η χυμοθρυψίνη λαβρακιού η οποία διασπά πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυλικό άκρο των αρωματικών και άλλων μεγάλων μη πολικών κατάλοιπων, χρησιμοποιήθηκε BTEE ως υπόστρωμα, η μέγιστη δραστηριότητα παρατηρήθηκε στα πυλωρικά τυφλά και το κατάλληλότερο διάστημα επιπέδου pH ήταν από 8 έως 8,2.

Η θρυψίνη λαβρακιού, η οποία διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες, στο καρβοξυλικό άκρο του αμινοξέως από πυλωρικά τυφλά και το έντερο με υπόστρωμα TAME, έδειξε πως η μέγιστη δραστηριότητα της ήταν στα πυλωρικά τυφλά, με τη δραστηριότητά της στο έντερο να είναι 10 φορές μικρότερη και το κατάλληλο διάστημα pH για τη μέγιστη δραστηριότητα μεταξύ 8,2 έως 9. Η καρβοξυπεπτιδάση Α και η καρβοξυπεπτιδάση Β υδρολύουν τον πεπτιδικό δεσμό καρβοξύ του τελικού άκρου των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Όταν οι καρβοξυπεπτιδάσες υδρολύουν υπόστρωμα hippuryl-L-phenylalactique η δραστηριότητα σε pH 8,5 είναι υψηλότερη από ότι σε pH 8. Η δραστηριότητα των πρωτεασών δεν εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος του υποστρώματος, αλλά από την κλασματική αποδόμηση του σιτηρεσίου, τη σύνθεση των αμινοξέων σε αυτό και την προσαρμογή της πρωτεΐνης (Alarcon et al., 2001).

Ο βαθμός της ενζυμικής υδρόλυσης των πρωτεϊνών *in vitro* με χρήση πεπτικά ένζυμα από πυλωρικά τυφλά ιχθύων και οι δραστηριότητές τους διαφέρει ανάλογα με το ιστορικό διατροφής αυτών των ιχθύων το οποίο είναι γενετικά προγραμματισμένο, επιτρέποντας την

προσαρμογή της δραστικότητας των ενζύμων ανάλογα με το παρεχόμενο σιτηρέσιο (Torrissen K. R. & Torrissen O. J., 1984).

Παράμετρος 6: επίδραση της όξινης προ-πέψης στην ενζυμική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών

Με δεδομένο ότι οι *in vitro* αναλύσεις τείνουν να προσομοιώνουν τις διαδικασίες οι οποίες συμβαίνουν στο πεπτικό σύστημα, ορισμένοι ερευνητές έχουν προσπαθήσει να προσομοιώνουν την πέψη στο στομάχι και το έντερο χρησιμοποιώντας πεψίνη και ένα ή περισσότερα αλκαλικά ένζυμα πρωτεασών (Alarcon et al., 2002; Saunders et al., 1972; Thresher et al., 1989).

Έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν μέθοδοι για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* με διπλή φάση πέψης, σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ακόλουθες:

Οι Gauthier et al. (1982) χρησιμοποίησαν πεψίνη κατά την όξινη ενζυμική πέψη σε pH 2, ακολούθησε αλκαλική παγκρεατική πέψη σε pH 8 για την ενζυμική υδρόλυση καζεΐνης, σόγιας και ελαιοκράμβης.

Οι Saunders et al. (1972) χρησιμοποίησαν παπαΐνη, πεψίνη, παγκρεατίνη στην πρώτη φάση και πεψίνη και θρυψίνη στη δεύτερη, για την ενζυμική υδρόλυση του τριφυλλίου.

Ο (Desrosiers, 1987) χρησιμοποίησε πεψίνη σε pH 1,9 στην πρώτη φάση και παγκρεατίνη σε pH 7,5 στη δεύτερη για την ενζυμική υδρόλυση του τυρόγαλου και άλλων υλικών για τη βιομηχανία τροφίμων.

Με την μέθοδο pH-stat έχει χρησιμοποιηθεί, για την όξινη φάση της πέψης κατά την ενζυμική υδρόλυση διαφόρων πηγών πρωτεΐνης, πεψίνη χοίρων, EC 3.4.23.1, Sigma P-7012 από τον Alarcon και άλλους (Alarcon et al., 2002 & 2001).

Στο παρόν πείραμα, η επίδραση της προ όξινης πέψης έδωσε καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος και πεψίνης κατά την όξινη φάση πέψης και κατά την αλκαλική φάση πέψης.

Από τα αποτελέσματα της αναπτυσσόμενης εξίσωσης απεδείχθη ότι αυξήθηκαν οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου NP, η οποία μεταβάλλεται με τη μεταβολή του επιπέδου pH κατά την όξινη πέψη από pH 4 σε pH 3 αν και η επίδραση στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης ήταν τελευταία στη σειρά των παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν περισσότερο το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης (Πίνακας 2.26.), (Εικόνα 2.20.) και δεν είχε καμία στατιστική διαφορά.

Στην μελέτη των Alarcon et al. (2002) για την αξιολόγηση των διαφόρων πρωτεϊνικών πηγών σιτηρεσίων με εκχυλίσματα ενζύμου τσιπούρας, τα δείγματα με ιχθυάλευρο στα οποία εφαρμόστηκε προ όξινη πέψη, έδωσαν το διπλάσιο περίπου βαθμό από αυτόν της αλκαλικής πέψης για το ίδιο χρονικό διάστημα. Στο παρόν πείραμα αυξάνεται ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης μόνο κατά 1,2 % και κατά 0,792 % στην προηγούμενη όξινη πέψη στα επίπεδα pH 3 και pH 4 αντίστοιχα από ότι είναι ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης κατά την

αλκαλική πέψη. Αυτή η διαφορά των αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλεται στη σύσταση του σιτηρεσίου και στην ταχύτητα ανάδευσης του μαγνητικού αναδευτήρα. Περισσότερο όμως μπορεί να οφείλεται στη δραστηριότητα των ενζύμων. Συγκεκριμένα ο (Alarcon et al., 2002) χρησιμοποίησε 1000 U ολικών οξινών πρωτεασών ενώ σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο μια μονάδα δραστηριότητας ανά εξεταζόμενο δείγμα.

Οι θετικές τιμές της παραμέτρου NP κατά την προηγούμενη όξινη πέψη υποδηλώνουν ότι μια υπερβολική υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών μπορεί να λάβει χώρα, κατά την χρήση του συστήματος pH-stat με όξινη επεξεργασία (HCL) και όξινες πρωτεάσες, σε σύντομο χρονικό διάστημα (1 h). Η προσομοίωση της διαδικασίας πέψης στους ιχθύες, σύμφωνα με τροποποιήσεις στη μεθοδολογία συνιστά την αποφυγή της υπερβολικής υδρόλυσης (Alarcon et al., 2002), (Dimes et al., 1994). Η όξινη πέψη επιδρά διαφορετικά στην υδρόλυση της πρωτεΐνης από ότι η αλκαλική πέψη. Η βελτίωση της μεθόδου pH-stat με χρήση ενζυμικών εκχυλισμάτων από αποσπάσματα στομάχου και εντέρου είναι στο στάδιο του ποσοτικού προσδιορισμού.

Σύμφωνα με τους Alarcon et al. (2002) οι διακυμάνσεις του επιπέδου pH στο στομάχι είναι περίπου pH 2,5 έως pH 5,5.

Στο πείραμα των Alliot et al. (1974), 3 ώρες μετά την κατάποση, το pH του χυμού του στομάχου είναι 2,1 έως 2,3, μετά το πέρας 48 ωρών το pH του αυξάνεται από 6,4 έως 6,7 στο λαβράκι. Η μείωση του επιπέδου pH κατά την όξινη πέψη σε σχέση με την αλκαλική συμβαίνει επειδή με την είσοδο του σιτηρεσίου στο στομάχι εκκρίνεται υδροχλωρικό οξύ (Wilson et al., 2002). Η δραστηριότητα της πεψίνης στον *S. aurata* περιορίζεται στο στομάχι (Deguara et al., 2003), όπως θα ανέμενε κανείς από τη γενική φυσιολογία του πεπτικού συστήματος.

Έτσι σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε ο βαθμός του επιπέδου pH κατά την όξινη πέψη σε pH3 και pH 4 για την κατανόηση συμπεριφοράς του σιτηρεσίου κατά την ενζυμική υδρόλυση.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN*
VITRO ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN VITRO* ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΙΤΗΡΕΣΙΑ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εναλλακτικές πηγές διατροφικών πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε αντικατάσταση του ιχθυάλευρου, θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μικρό κόστος, ικανοποιητική διαθεσιμότητά και υψηλή διατροφική αξία. Αν και όλα τα διατροφικά υλικά περιέχουν πρωτεΐνες, μόνο αυτά τα οποία περιέχουν κατ'ελάχιστο 35 % πρωτεΐνη μπορούν να θεωρηθούν πηγές πρωτεΐνης προς χρήση σε σιτηρέσια σαρκοφάγων ιχθύων (Sugiura, 2000). Το μπιζέλι (*Pisum sativum*) και το ρεβίθι (*Cicer arietinum*) είναι πλούσια στα περισσότερα απαραίτητα αμινοξέα, ιδιαίτερα σε λυσίνη, άλλα είναι φτωχά σε θείο το οποίο περιέχουν τα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Η μεγάλη θρεπτική τους αξία και οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας στην περιοχή της Μεσογείου καθιστούν και τα δύο είδη όσπρια με μεγάλη κατανάλωση. Αυτές οι δύο διατροφικές ύλες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών από παλιά, ενώ οι Monsoor και Yusuf (2002) προσδιόρισαν την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* χρησιμοποιώντας εμπορικά ένζυμα (πενΐνη και παγκρεατίνη) με σκοπό τη χρήση των αποτελεσμάτων για τη διατροφή του ανθρώπου. Η σχετική περιεκτικότητα μιας πηγής πρωτεΐνης σε αμινοξέα και η πεπτικότητα αυτής είναι που καθορίζουν τη διατροφική της αξία. Η μέθοδος προσδιορισμού της πεπτικότητας που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2, έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της καταλληλότητας διαφόρων φυτικών και ζωικών πρώτων υλών ως πρωτεϊνικών πηγών, τόσο για τον άνθρωπο όσο και τα κτηνοτροφικά ζώα (Rozan et al., 1997; Moughan et al., 1989) και για την αξιολόγηση διαφόρων πηγών πρωτεΐνης, οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή σιτηρεσίων στην τσιπούρα (Alarcon et al., 2002).

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι: α) η μέτρηση της πεπτικότητας *in vitro* του μπιζελιού και του ρεβιθιού με χρήση του συστήματος pH-stat, για την εκτίμηση της καταλληλότητάς τους ως πηγές φυτικής πρωτεΐνης σε σιτηρέσια και β) η συσχέτιση των μετρήσεων πεπτικότητας με το σύστημα pH-stat *in vitro* με μετρήσεις πεπτικότητας *in vivo* (Νικολοπούλου, 2008) σε τσιπούρα. Παρόμοια συσχέτιση έκαναν ο Thresher et al. (1989) για την πεπτικότητα διαφόρων τροφίμων, συγκρίνοντας τα αποτελέσματά του με αυτά των Chang και άλλων, Eggum και άλλων, Sarwar και άλλων. Ο Saunders et al. (1972) έκαναν συσχέτιση της πεπτικότητας του τριφυλλιού (alfalfa) με τα αποτελέσματα του Akesson και άλλων και του Buchanan και άλλων.

Με ένζυμα νεαρών ατόμων τσιπούρας (Alarcon et al., 1999), ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών μικροκαψούλων χρησιμοποιώντας την μέθοδο pH-stat είχε

ισχυρή συσχέτιση ($r^2 = 0,99$) με το συντελεστή αποδόμησης των πρωτεϊνών (Coefficient of Protein Degradation, CPD). Στην γαρίδα *Litopenaeus vannamei*, ο μέσος όρος βάρους των πειραματικών ατόμων, τα οποία σιτίστηκαν με έξι διαφορετικά σιτηρέσια σε πειραματική περίοδο 56 ημερών, διέφεραν ανάλογα με το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης του κάθε σιτηρεσίου καθώς βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ τους ($r^2 = 0,72$ έως $0,80$) (Lemos & Nunes, 2008). Η ποιότητα των πρωτεϊνών ως βιοχημική δόμηση, δηλαδή η περιεκτικότητά τους σε σουλφονικές ομάδες (SH) και η αναλογία σουλφονικών ομάδων / δισουλφιδικών δεσμών SH/S-S, συσχετίζεται θετικά με τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης $r^2 = 0,68$ και $r^2 = 0,77$ αντίστοιχα και η περιεκτικότητά τους σε D-Ασπαρτικό οξύ συσχετίζεται αρνητικά με τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιώντας ένζυμα σολομού βάρους 1 kg με την μέθοδο pH-stat (Rungruangsak-Torrissen, 2002). Οι Dimes & Haard (1994) εξέτασαν τη μέθοδο pH-stat συγκρίνοντας τα αποτελέσματα πεπτικότητας σιτηρεσίων, χρησιμοποιώντας πεπτικά ένζυμα πυλωρικών τυφλών σολομού βάρους 250-500 g κατά την υδρόλυση σε θερμοκρασία 37 °C, με των δεικτών πεπτικότητας των ίδιων σιτηρεσίων *in vivo*. Τα αποτελέσματα συσχέτισης (r^2) κυμάνθηκαν από 0,82 έως 0,84. Αυτή η μέθοδος θεωρήθηκε καλύτερη από τη μέθοδο pH-shift της οποίας τα αποτελέσματα συσχέτισής της με τους δείκτες πεπτικότητας *in vivo* κυμάνθηκαν από 0,71 έως 0,73.

Οι Chong et al.,(2002) μελέτησαν τέσσερις μεθόδους χρήσης πεπτικών ενζύμων, για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* στο *Symphysodon aequifasciata*: τη Lazo με εμπορικό ένζυμο θρυψίνης, τη Hsu με εμπορική θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και πεπτιδάσε, τη Saterleemulti-enzyme εμπορικό σκεύασμα πρωτεασών και ένζυμο εντέρου *Symphysodon aequifasciata* με δραστηριότητα 0,50 unit / mg protein. Τα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων, στη μέτρηση της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης διατροφικών υλών με διαφορετικές πηγές διατροφικής πρωτεΐνης (σόγια, καζέϊνη, κρεατάλευρο, άλευρο πουλερικών, σιταριού, βοδινής καρδιάς και ιχθυάλευρου Δανίας), διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά. Η χρήση ενζύμων εντέρου ψαριού έδωσε συντελεστή συσχέτισης (r^2) = 0,87 με τους δείκτες πεπτικότητας *in vivo*, ο οποίος ήταν μικρότερος από ότι στις υπόλοιπες μεθόδους χρήσης πεπτικών ενζύμων.

Ο Alarcon (2002) είχε θετική συσχέτιση κατά την υδρόλυση του ιχθυάλευρου και του λουπινάλευρου, σε εύρος αναλογιών συγκέντρωσης σιτηρεσίου ανά 250 μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας από 50 έως 1500 μg diet protein με χρήση γραμμικής εξίσωσης, (r^2) = 0,938 και 0,996 αντίστοιχα.

3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οκτώ (8) πειραματικά σιτηρέσια παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Διατροφής του Ε.Λ.ΚΕ.ΘΕ. (Αγ. Κοσμάς, Αθήνα), που περιείχαν μπιζέλι ή ρεβίθι μετά από διάφορες τεχνικές επεξεργασίας (Πίνακας 3.1).

Πεπτικότητα *in vivo*

Τα σιτηρέσια περιείχαν Cr_2O_2 που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας *in vivo* (Νικολοπούλου, 2008) σε άτομα τσιπούρας βάρους 200g και θερμοκρασία 27°C. Για τον προσδιορισμό της πεπτικότητας *in vivo* εφαρμόστηκε η μέθοδος συλλογής των περιττωμάτων, κατά την οποία τα ψάρια εγκλιματίστηκαν για 7 ημέρες σε κάθε σιτηρέσιο και στη συνέχεια ακολούθησε συλλογή των περιττωμάτων για άλλες 7 ημέρες. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές (Νικολοπούλου, 2008). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο *in vivo* υπολογίζεται ο συντελεστής φαινομενικής πεπτικότητας (Glencross et al., 2007) συγκρίνοντας την περιεκτικότητα των θρεπτικών ουσιών, οι οποίες περιέχονται στα σιτηρέσια με αυτές των περιττωμάτων. Η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών είναι η συνολική ποσότητα των θρεπτικών συστατικών τα οποία έχουν απορροφηθεί από το έντερο.

Ο υπολογισμός έγινε με την εξής εξίσωση:

$$(\%) \Sigma.\Delta.\Pi. \Theta_P = 100 - \left[\left\{ (\% \text{ δείκτη σιτηρέσιο} - \% \text{ δείκτη περιττώματα}) * \right. \right. \\ \left. \left. (\% \Theta \Sigma \text{ περιττωμάτων}) \div (\% \Theta \Sigma \text{ σιτηρέσιο}) \right\} * 100 \right]$$

Όπου, $\Theta \Sigma$: θρεπτικό συστατικό και $(\%) \Sigma.\Delta.\Pi. \Theta_P$: σχετικός δείκτης πεπτικότητας για κάθε θρεπτικό συστατικό (πρωτεΐνη, λίπος, άμυλο) (Νικολοπούλου, 2008). Οι συντελεστές φαινομενικής πεπτικότητας πρωτεΐνης των πειραματικών σιτηρεσίων αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.

Πεπτικότητα *in vitro*

Εφαρμόζοντας τη μέθοδο pH-stat όπως αυτή περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, προσδιορίστηκε η πεπτικότητα των διατροφικών πρωτεϊνών των πειραματικών σιτηρεσίων που περιγράφονται στον Πίνακα 3.1. Ο βαθμός αυτουδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης προσδιορίστηκε για κάθε σιτηρέσιο σε τέσσερις διαφορετικές αναλογίες συγκεντρώσεων σιτηρεσίου ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ολικών αλκαλικών πρωτεασών 1,2μg, 1,8μg, 1,6μg και 20 μg διατροφικής πρωτεΐνης / U. Για τις μετρήσεις *in vitro* χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πεπτικών ενζύμων από πυλωρικά τυφλά τσιπούρας οι οποίες είχαν σιτιστεί με το σιτηρέσιο CB.

Στο ενζυμικό εκχύλισμα προσδιορίστηκε η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών σύμφωνα με τον García-Carreño (1992), με χρήση 1,5% αζοκαζεΐνης ως υπόστρωμα, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCL, pH=9,0. Η απορρόφηση του υπερκείμενου καταγραφόταν στα 280nm και η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως 1 μg

τυροσίνης, το οποίο απελευθεωνόταν κάθε λεπτό, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 1280/M/cm.

Η εκτέλεση των πειραμάτων *in vitro* έγινε σε θερμοκρασία 25 °C, pH 8, αλατότητα 0 %.

Από τα δεδομένα που προέκυψαν υπολογίστηκε η μεταβλητή παράμετρος N που αφορούσε στην πηγή της διατροφικής πρωτεΐνης και τις τεχνικές επεξεργασίας οσπρίων (ΝΤΠ).

Πίνακας 3.1. Σύνθεση και ποσοστιαία σύσταση (%) των πειραματικών σιτηρεσίων σε άτομα τσιπούρας (Νικολοπούλου, 2008)

	CA	CB	ChP	ChPx	ChPD	ChPDx	P	Px
Ιχθυάλευρο	48,2	60,5	50,7	51,7	52,7	52,4	53,5	54,5
Σόγια εξωθημένη	20							
Άλευρο σίτου	18,28	27,08						
MCP	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Ιχθυέλαιο	11,19	10,2	9,5	9,9	9,3	9,8	10,6	10,7
Βιταμίνες / Ιχνοστοιχεία	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12
Ρεβίθι			37,48					
Ρεβίθι εξωθημένο				36,08				
Ρεβίθι αποφλοιωμένο					35,68			
Ρεβίθι αποφλοιωμένο & εξωθημένο						35,48		
Μπιζέλι							33,58	
Μπιζέλι εξωθημένο								32,48
Cr ₂ O ₂	1	1	1	1	1	1	1	1

Ολική σύσταση επί ξηρού

Ξηρό υλικό	92,46	92,05	88,72	91,74	90,23	92,54	91,39	92,57
Πρωτεΐνη	48,92	48,20	44,67	48,21	49,16	48,21	48,20	48,77
Λίπος	16,96	15,73	24,03	16,25	16,41	16,76	15,64	17,79
Άμυλο	14,71	21,90	13,01	16,53	16,36	16,00	16,64	17,42
Τέφρα	10,80	13,01	10,37	10,76	10,72	10,64	10,64	10,43
Ολικοί ΜΑΠ*	6,49	4,43	5,12	3,92	4,11	4,88	3,09	4,67

*ΜΑΠ : Μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες

Τα αποτελέσματα της πεπτικότητας *in vivo* και *in vitro* συγκρίθηκαν βάσει της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, το χρονικό διάστημα για την απόκτηση των αποτελεσμάτων, το οικονομικό κόστος της ανάλυσης.

Πίνακας 3.2. (%) Σχετικοί δείκτες πεπτικότητας πρωτεϊνών των πειραματικών σιτηρεσίων (Νικολοπούλου, 2008)

Σιτηρέσιο	Πρωτεΐνες
CA	92,3
CB	95,1
ChP	88,0
ChPD	74,4
P	86,4
ChPx	88,3
ChPDx	90,5
Px	88,3

3.2.1 Ανάπτυξη εξίσωσης και συσχέτιση των πειραματικών τιμών της μεταβλητής παραμέτρου NTΠ και στατιστική επεξεργασία

Τα πειραματικά σιτηρέσια διέφεραν μεταξύ τους ως προς την πηγή διατροφικής πρωτεΐνης και τη μέθοδο επεξεργασίας οσπρίων. Βάση αυτών των δύο διατροφικών παραγόντων, έγινε υπόθεση της μεταβλητής διατροφικής παραμέτρου N που συνοψίζει την πηγή διατροφικής πρωτεΐνης και τις τεχνικές επεξεργασίας οσπρίων (NTΠ). Με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 5 αναπτύχθηκε μια νέα εξίσωση στην οποία ενσωματώθηκε η νέα μεταβλητή παράμετρος. Επίσης το ίδιο πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε στην εύρεση και σύγκριση εξισώσεων, την ταξινόμηση πειραματικών δεδομένων, την εύρεση σταθερών τιμών, τον υπολογισμό της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων, τον υπολογισμό της διαφοράς μεταξύ των προβλεπόμενων βαθμών και των πειραματικών βαθμών υδρόλυσης και στον υπολογισμό των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης (NTΠ). Επισημαίνεται πως οι περιβαλλοντικές παράμετροι ήταν σταθερές, η παράμετρος της προ-όξινης πέψης και η παράμετρος του ενζυμικού προφίλ δεν εξετάστηκαν στα πειραματικά δεδομένα αυτού του κεφαλαίου, οπότε δεν συμπεριλήφθησαν στην εξίσωση που αναπτύχθηκε.

Ο υπολογισμός του συντελεστή μη γραμμικών συσχετίσεων έγινε σύμφωνα με την αναπτυσσόμενη εξίσωση. Για τη συσχέτιση της μεταβλητής παραμέτρου (NTΠ) με τους δείκτες πεπτικότητας των πρωτεϊνών των σιτηρεσίων στο πείραμα *in vivo* χρησιμοποιήθηκε γραμμική συσχέτιση με το πρόγραμμα Microsoft® Office Excel® 2007. Η στατιστική επεξεργασία έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1. Στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων

Στη στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ανάλυσης διασποράς με δυο παράγοντες (Two Way ANOVA) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση του είδους του σιτηρεσίου, λόγω της ισχυρής συσχέτισης αυτής της επίδρασης με την επίδραση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου (Πίνακας 3.3.). Η συγκέντρωση του σιτηρεσίου είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης. Η αλληλεπίδραση του είδους του σιτηρεσίου με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική. Η εφαρμογή της ανάλυσης έγινε σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Η επίδραση του επιπέδου pH στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης είναι εμφανής στις μικρές συγκεντρώσεις σιτηρεσίου (Εικόνα 3.1.). Αυτή η επίδραση μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου. Έτσι στις μεγάλες συγκεντρώσεις αυτή η επίδραση ήταν μικρή. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD (Πίνακας 3.4.) για τη σύγκριση των μέσων όρων των ζευγών των διαφόρων σιτηρεσίων σε αλληλεπίδραση με τη συγκέντρωση του σιτηρεσίου, αποδείχθηκε ότι υπάρχουν στατιστικές διαφορές σε διάφορους συνδυασμούς οι οποίοι εξετάστηκαν, σε κάθε επίπεδο σημαντικότητας. Το σιτηρέσιο ChPD το οποίο είχε αποφλοιωμένο ρεβίθι ως πηγή διατροφικής πρωτεΐνης διέφερε από όλα τα υπόλοιπα σιτηρέσια (Πίνακας 3.4.).

Πίνακας 3.3.: Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Πηγή παραλλακτικότητας	Είδος σιτηρεσίου	Συγκέντρωση σιτηρεσίου	Είδος σ. * Συγκέντρωση σ.
	-	*	*

Πίνακας 3.4.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD

Είδος σιτηρεσίου	CA	CB	ChP	ChPx	ChPD	ChPDx	P
CA							
CB	-						
ChP	*	*					
ChPx	*	*	-				
ChPD	**	**	*	*			
ChPDx	-	*	-	-	*		
P	*	*	-	-	*	-	
Px	*	*	-	-	*	-	-

3.3.2. Ανάπτυξη εξίσωσης για τα διάφορα σιτηρέσια διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης

Η καταλληλότερη εξίσωση για την περιγραφή των αποτελεσμάτων κρίθηκε η εξίσωση εκθετικής αποσύνθεσης μιας φάσης (One phase exponential decay), η οποία περιγράφεται ως εξής:

$$Y = f(x) + NTPI = (\text{Span} * e^{(-K * X)}) + (NTPI)$$

Οι καλύτερες τιμές για την τέλεια προσαρμογή της εξίσωσης με τα πειραματικά δεδομένα των βαθμών αυτοϋδρόλύσεων ήταν:

$$\text{Span} = 85,49$$

$$K = 1,063$$

Οι καλύτερες τιμές για την τέλεια προσαρμογή της εξίσωσης με τα πειραματικά δεδομένα των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης ήταν:

$$\text{Span} = 98,83$$

$$K = 1,037$$

X = αναλογία συγκέντρωσης σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας

Y = βαθμοί αυτοϋδρόλύσεων και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των διαφόρων σιτηρεσίων.

Από την εξέταση επαλήθευσης των χαρακτηριστικών της εξίσωσης προκύπτει ότι η αναπτυσσόμενη εξίσωση προβλέπει τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης και τους βαθμούς αυτοϋδρόλύσεων με επιτυχία (Πίνακες 3.3 & 3.4). Οι τιμές συσχετίσεων είναι μεγαλύτερες από το 0,80 σε όλα τα σιτηρέσια. Η μεταβλητή παράμετρος NTPI μεταβάλλεται ανάλογα με τη μέθοδο επεξεργασίας των οσπρίων και την πηγή διατροφικής πρωτεΐνης για τη χρήση της στα σιτηρέσια. Η τιμή αυτής της διατροφικής παραμέτρου για κάθε σιτηρέσιο είναι μεγαλύτερη κατά την ενζυμική υδρόλυση από ότι κατά την αυτοϋδρόλυση, δηλ. ο προβλεπόμενος βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης είναι μεγαλύτερος από το βαθμό αυτοϋδρόλυσης, γεγονός που συμβαδίζει με τα πειραματικά δεδομένα *in vitro*.

Τα σιτηρέσια CA και CB (Εικόνα 3.1.; Εικόνα 3.2.), τα οποία περιείχαν ιχθυάλευρο και ποσοστό εξωθημένης σόγιας αντίστοιχα, έδωσαν μεγαλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης στις πειραματικές τιμές και στις προβλεπόμενες τιμές της αναπτυσσόμενης εξίσωσης. Η διαδικασία αποφλοιώσης του ρεβιθίου έδωσε το μικρότερο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης κατά την υδρόλυση του σιτηρεσίου ChPD (Εικόνα 3.5.). Το σιτηρέσιο P (Εικόνα 3.7) είχε την μικρότερη διαφορά μεταξύ των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης Δ P(NTPI). Το σιτηρέσιο ChP (Εικόνα 3.3.), το οποίο έχει ρεβίθι χωρίς επεξεργασία ως πηγή διατροφικής πρωτεΐνης, δεν έδωσε καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης από το εξωθημένο ρεβίθι ChPx (Εικόνα 3.4.) και από το ρεβίθι το εξωθημένο και αποφλοιωμένο ChPDx (Εικόνα 3.6.). Η διαδικασία

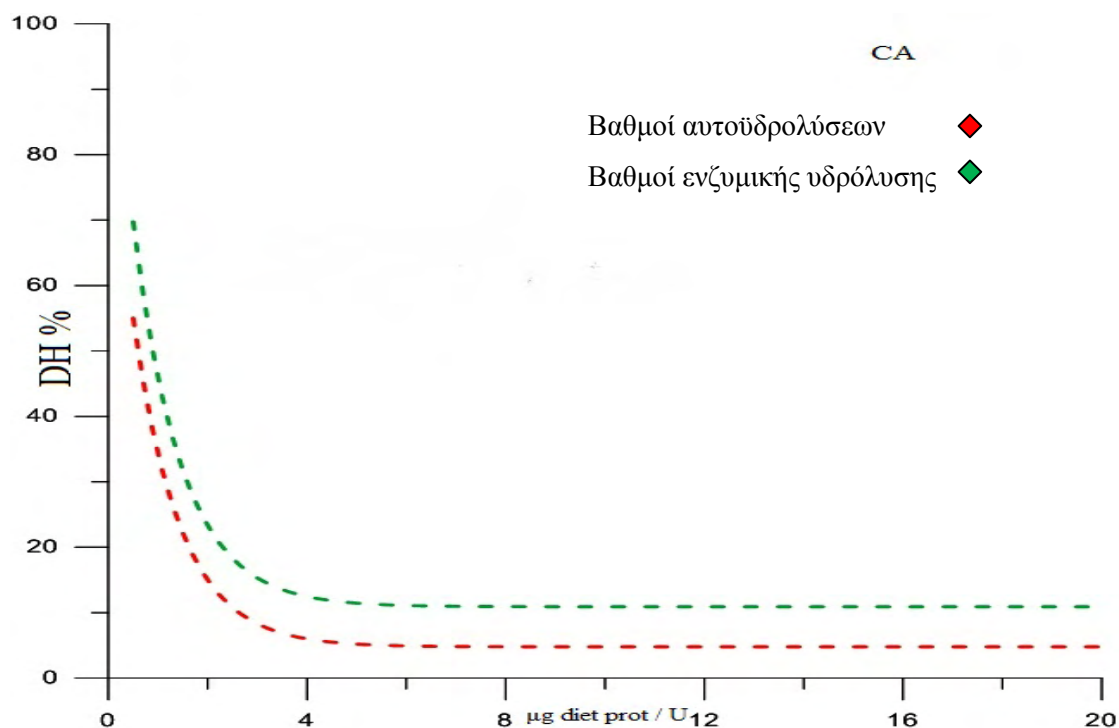
εξώθησης του μπιζελιού Px βελτίωσε λίγο την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης (Εικόνα 3.8). Οι διάφοροι μέθοδοι επεξεργασίας οσπρίων βελτίωσαν λίγο την πεπτικότητα των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων χωρίς στατιστική διαφορά και σε σημείο το οποίο δεν ξεπερνά την πεπτικότητα του σιτηρεσίου CB το οποίο περιέχει ιχθυάλευρο. Η διαφορές των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου NTΠ στην αυτοϋδρόλυση και την ενζυμική υδρόλυση ήταν μικρές.

Πίνακας 3.5.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης της μεταβλητής παραμέτρου NTΠ κατά την αυτοϋδρόλυση. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς εξετάσεις επαλήθευσης

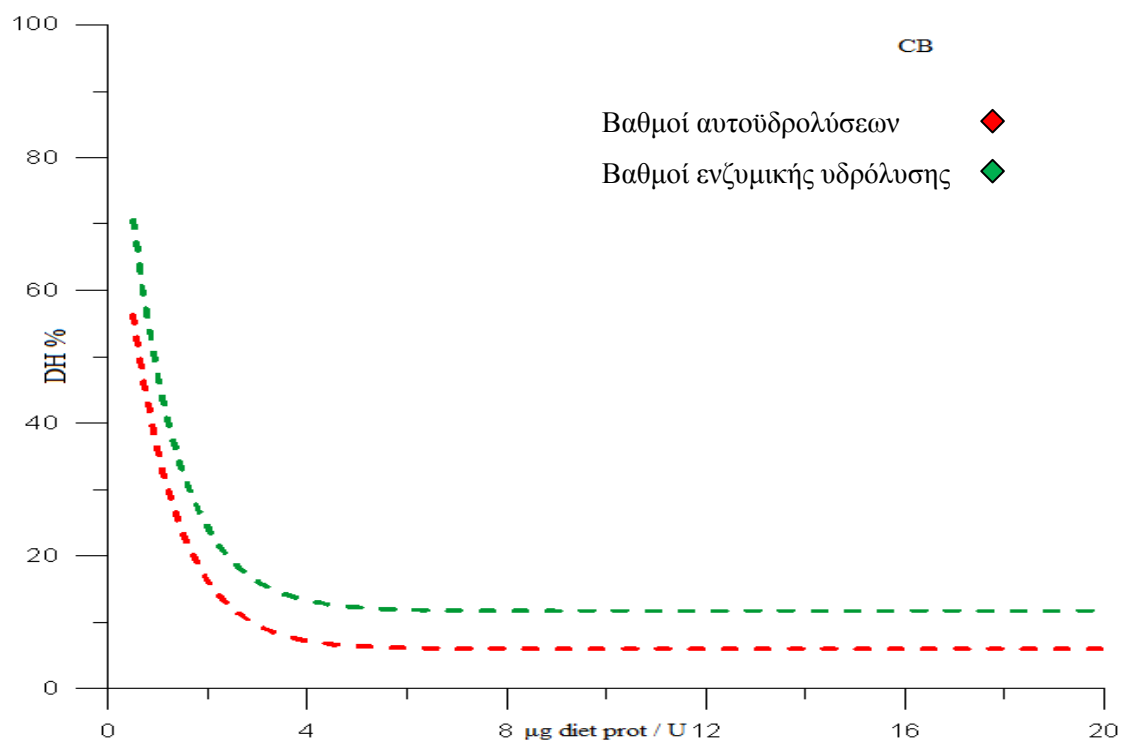
Είδος σιτηρεσίου	Τιμές (NTΠ)	r^2	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-
CA	4,77	0,8545	4	4,17	0,9077*	0,3671
CB	5,99	0,8576	7	2,95	0,8635*	0,2920
ChP	4,18	0,8534	4	3,77	0,8471*	0,3757
ChPx	4,47	0,8456	4	4,57	0,8476*	0,2989
ChPD	3,32	0,8875	4	2,46	0,8179*	0,2900
ChPDx	4,49	0,8573	5	3,69	0,8536*	0,2888
P	4,32	0,8913	7	3,87	0,8679*	0,3488
Px	4,44	0,8363	4	4,49	0,7797*	0,3230

Πίνακας 3.6.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης της μεταβλητής παραμέτρου NTΠ κατά την ενζυμική υδρόλυση. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς εξετάσεις επαλήθευσης

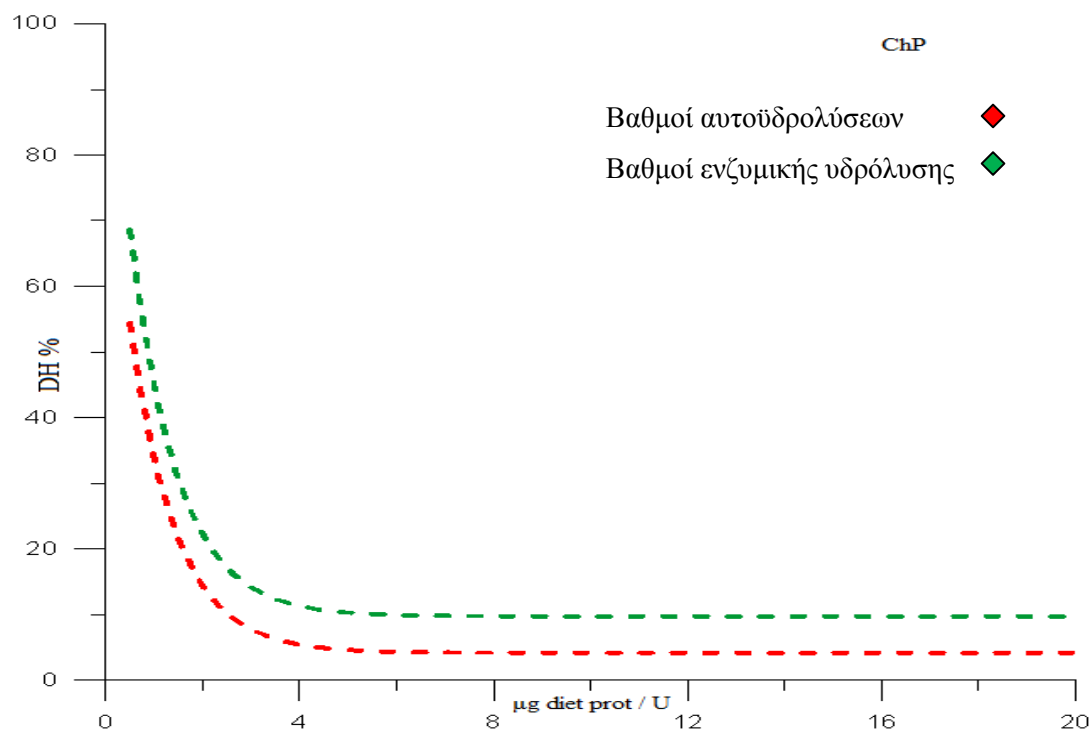
Είδος σιτηρεσίου	Τιμές (NTΠ)	r^2	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-
CA	10,90	0,85	6	4,59	0,8179*	0,3671
CB	11,69	0,86	4	3,97	0,8797*	0,2923
ChP	9,73	0,85	4	4,69	0,8879*	0,2956
ChPx	9,83	0,90	5	2,46	0,8736*	0,3987
ChPD	6,86	0,88	7	3,29	0,8475*	0,2428
ChPDx	10,36	0,89	7	2,85	0,8459*	0,3753
P	9,36	0,84	4	4,07	0,8625*	0,2595
Px	9,79	0,85	5	4,57	0,8577*	0,4723



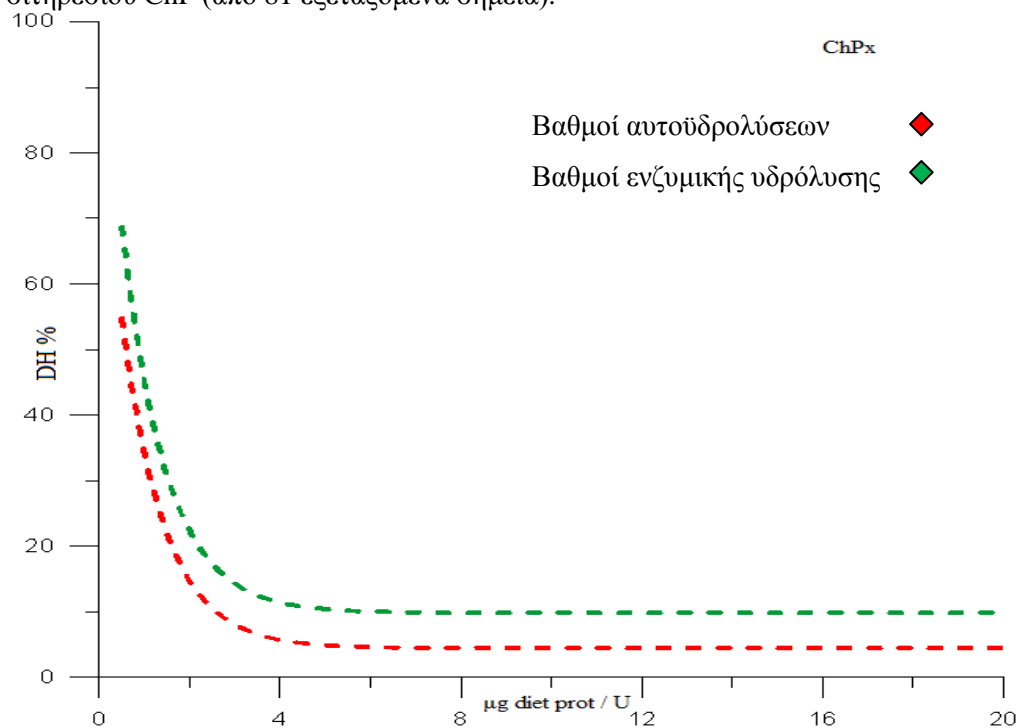
Εικόνα 3.1.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρολύσεως και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου CA (από 81 εξεταζόμενα σημεία).



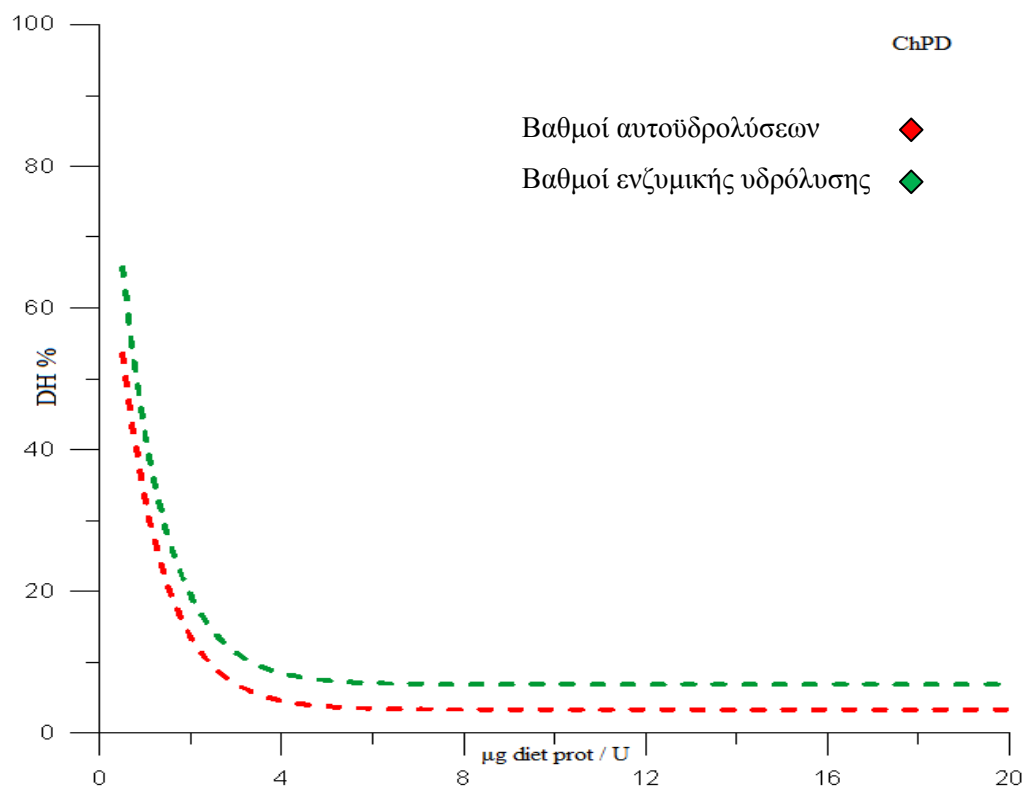
Εικόνα 3.2.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρολύσεως και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου CB (από 81 εξεταζόμενα σημεία).



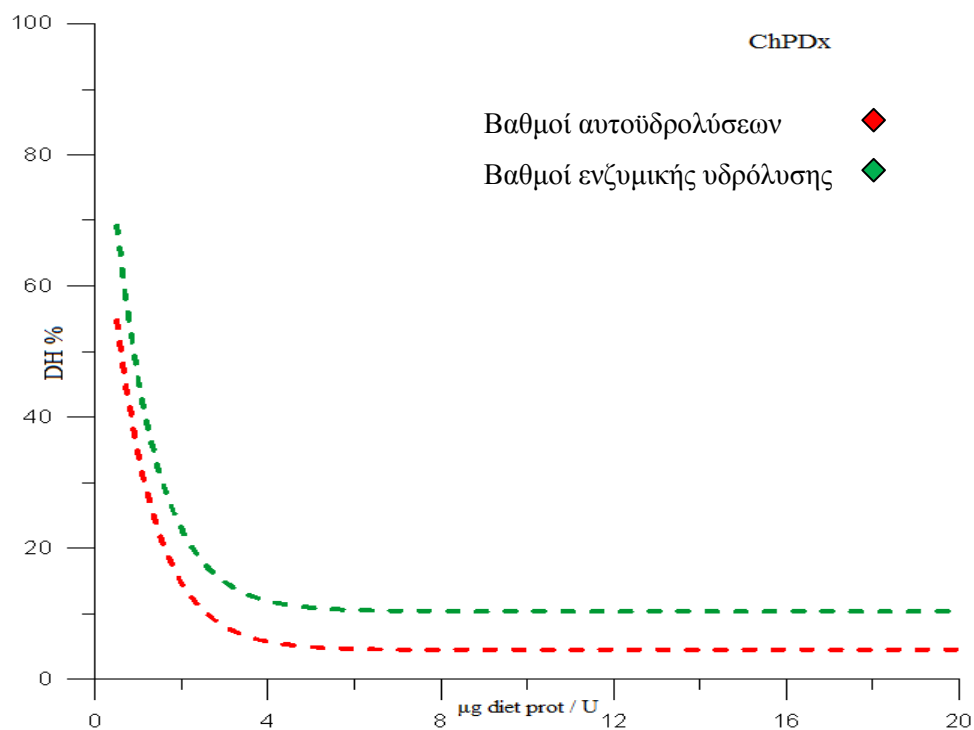
Εικόνα 3.3.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρολύσεως και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChP (από 81 εξεταζόμενα σημεία).



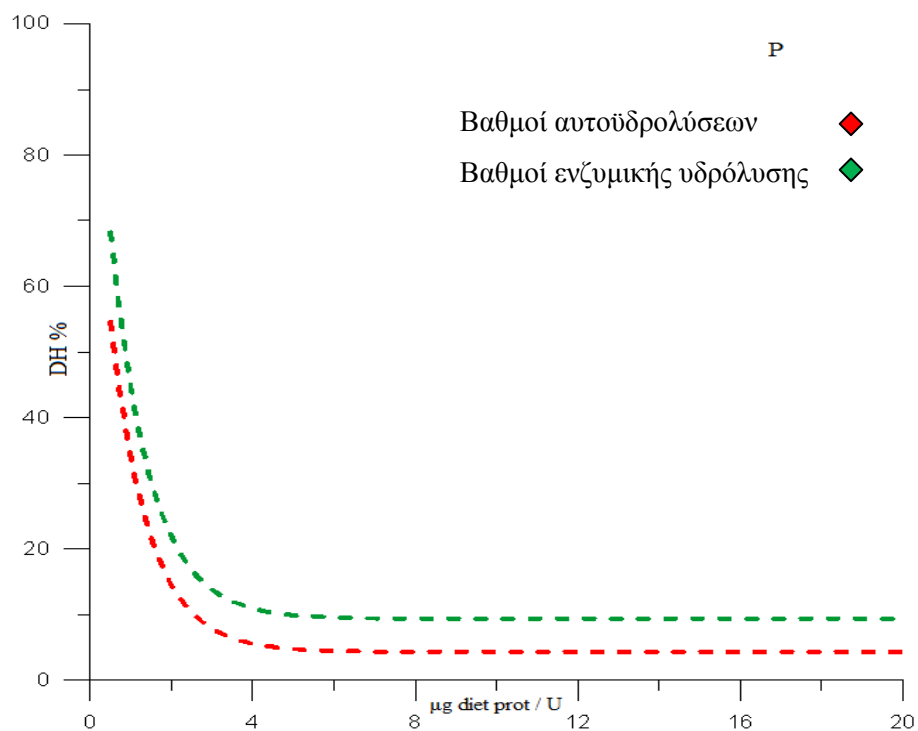
Εικόνα 3.4.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρολύσεως και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChPx (από 81 εξεταζόμενα σημεία).



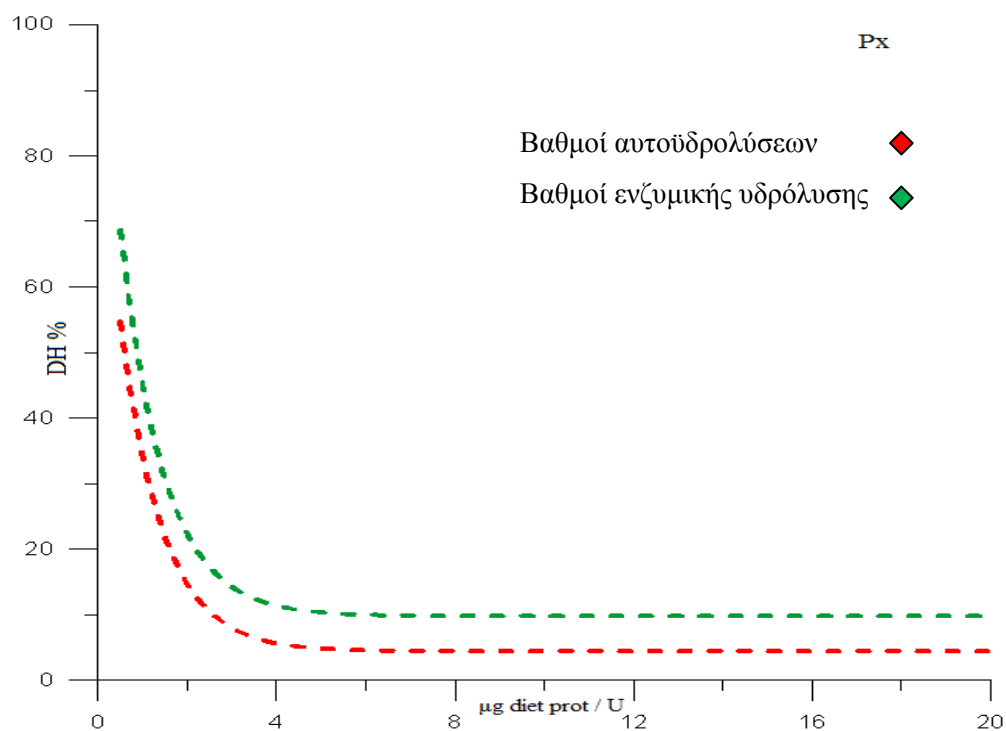
Εικόνα 3.5.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρολύσεως και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChPD (από 81 εξεταζόμενα σημεία).



Εικόνα 3.6.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρολύσεως και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου ChPDx (από 81 εξεταζόμενα σημεία).



Εικόνα 3.7.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου P (από 81 εξεταζόμενα σημεία).

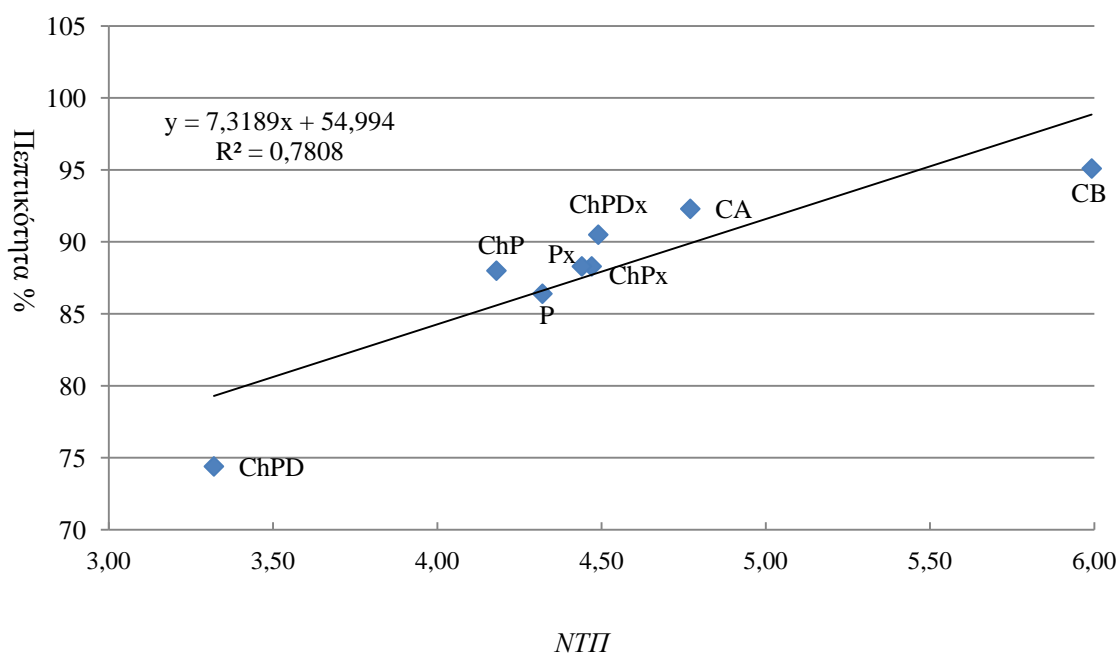


Εικόνα 3.8.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των βαθμών αυτοϋδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών σε αυξανόμενη συγκέντρωση του σιτηρεσίου Px (από 81 εξεταζόμενα σημεία).

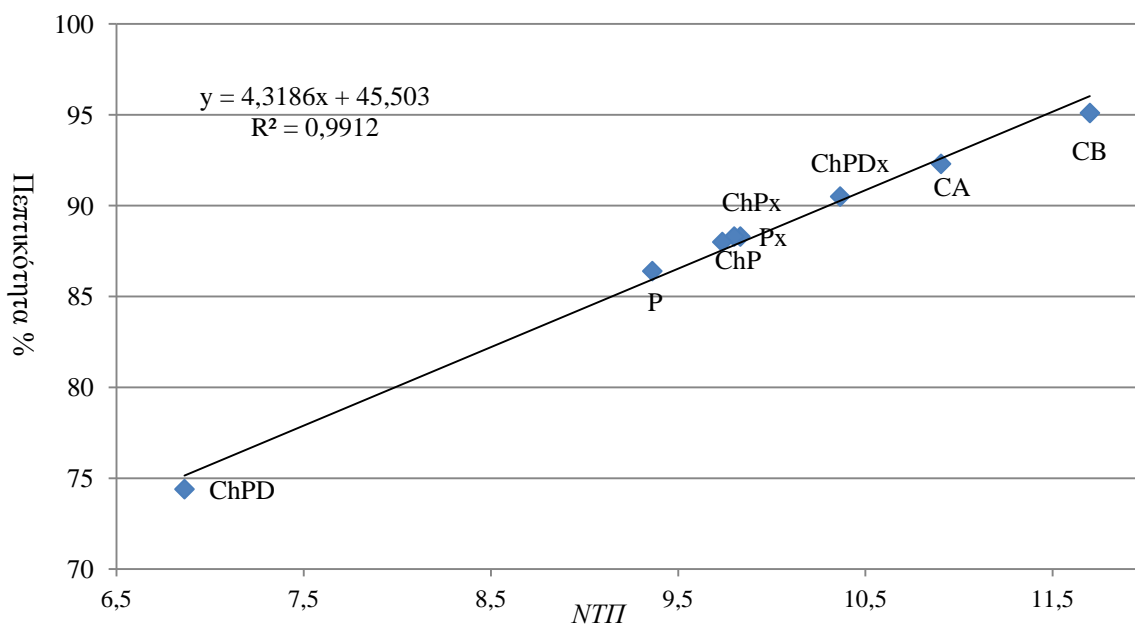
3.3.3 Σύγκριση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ με τους δείκτες πεπτικότητας των πρωτεϊνών του πειράματος *in vivo*

Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ, οι οποίες παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.3 και 3.4 για την αυτοϋδρόλυση (Εικόνα 3.1) και την ενζυμική υδρόλυση (Εικόνα 3.2) αντίστοιχα, συσχετίστηκαν με τους δείκτες πεπτικότητας κάθε σιτηρεσίου *in vivo*. Οι δείκτες πεπτικότητας του πειράματος *in vivo* τοποθετήθηκαν κατά αύξουσα σειρά στο άξονα Υ, ύστερα από τον υπολογισμό των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ με το πρόγραμμα GraphPad Prism και τοποθετήθηκαν βάση της αύξουσας σειράς των δεικτών πεπτικότητας στον άξονα Χ. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ κατατάχθηκαν με την ίδια σειρά εκτός από την τιμή του σιτηρεσίου Ρ το οποίο περιέχει μπιζέλι ως πηγή διατροφικής πρωτεΐνης στην αυτοϋδρόλυση (Εικόνα 3.9.). Οι τιμές ΝΤΠ κατά την ενζυμική υδρόλυση κατατάχθηκαν ακριβώς με την ίδια σειρά δίνοντας συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο αυτού της αυτοϋδρόλυσης (Εικόνα 3.10.).

Οι δείκτες πεπτικότητας του πειράματος *in vivo* είναι μεγαλύτεροι από το βέλτιστο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης. Όταν το σιτηρέσιο CB (Εικόνα 3.1) το οποίο περιείχε ιχθυάλευρο ως βασική πηγή πρωτεΐνης είχε $DH = 70,54\%$ στη συγκέντρωση υποστρώματος $0,5 \mu\text{g diet protein} / \text{U}$ με χρήση της αναπτυσσόμενης εξίσωσης και είχε $DH = 40,22\%$ στη συγκέντρωση υποστρώματος $1,2 \mu\text{g diet protein} / \text{U}$ από τα πειραματικά δεδομένα τα οποία προέκυψαν από την υδρόλυση του σιτηρεσίου, οι πειραματικές τιμές *in vivo* των δεικτών πεπτικότητας του ίδιου σιτηρεσίου ήταν $95,1\%$. Αυτή η διαφορά επαναλαμβάνεται και με τα υπόλοιπα σιτηρέσια. Τέτοιες διαφορές μπορεί να οφείλονται σε μεθοδολογικά σφάλματα.



Εικόνα 3.9.: Γραμμική συσχέτιση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης κατά την αυτοϋδρόλυση με τους δείκτες πεπτικότητας των πρωτεϊνών *in vivo*.



Εικόνα 3.10.: Γραμμική συσχέτιση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης κατά την ενζυμική υδρόλυση με τους δείκτες πεπτικότητας των πρωτεϊνών *in vivo*.

3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης (ΝΤΠ), οι οποίες προέκυψαν από την ανάπτυξη των εξισώσεων για την περιγραφή της ενζυμικής υδρόλυσης και της αυτουδρόλυσης *in vitro* (Εικόνα 3.9., 3.10.) των πειραματικών σιτηρεσίων μπιζελιού και ρεβιθιού με τους δείκτες φαινομενικής πεπτικότητας των σιτηρεσίων *in vivo*, υποστηρίζει την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου pH-stat στη μέτρηση των δεικτών πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών. Επίσης, παρόλο το σχετικά μέτριο αριθμό δεδομένων (81 εξεταζόμενα σημεία) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξη της συγκεκριμένης εξίσωσης καταδεικνύεται ότι οι εξισώσεις διαφορικού λογισμού μη γραμμικών συσχετίσεων εκφράζουν επαρκώς και αξιόπιστα τα πειραματικά δεδομένα του συστήματος pH-stat.

Όπως αναμενόταν, οι βαθμοί ενζυμικής υδρόλυσης των πειραματικών σιτηρεσίων ήταν μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους βαθμούς αυτουδρόλυσης, άσχετα από το είδος και την τεχνική επεξεργασίας των οσπρίων. Αυτό οφείλεται στην καταλυτική ιδιότητα των πεπτικών ενζύμων που είναι παρόντα στο ενζυμικό εκχύλισμα και επιταχύνουν την υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης (Eshel et al., 1993). Έτσι οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου N τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης ήταν μεγαλύτερες για τα πειραματικά δεδομένα της ενζυμικής υδρόλυσης, από αυτές της αυτουδρόλυσης. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ κατά την ενζυμική υδρόλυση όλων των σιτηρεσίων διάφεραν ελάχιστα μεταξύ τους (Πίνακας 3.4). Το ίδιο συνέβη και με τις τιμές αυτής της μεταβλητής παραμέτρου κατά την αυτουδρόλυση (Πίνακας 3.3). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο σχετικά μέτριο αριθμό παρατηρήσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της εξίσωσης σε σχέση με εξισώσεις, οι οποίες μελετήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (387 παρατηρήσεις σε 8 συγκεντρώσεις υποστρώματος). Η ανάπτυξη της εξίσωσης για τα διάφορα σιτηρέσια και η αναπαράστασή της δεν έδωσε σημαντική διαφορά μεταξύ του κάθε σιτηρεσίου.

Η διαδικασία της εξώθησης είναι μια από τις μεθόδους αξιολόγησης της λειτουργικότητας ενός διατροφικού συστατικού (Glencross et al., 2007). Έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι η θερμική επεξεργασία του μπιζελιού και του ρεβιθιού βελτιώνει την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, καθώς μετουσιώνει τους αναστολείς πρωτεασών (Monsoor & Yusuf, 2002; Νικολοπούλου, 2008), με αποτέλεσμα να αίρεται η ανασταλτική τους δράση. Γενικά, έχει αποδειχτεί ότι η θερμική επεξεργασία μέσω της διαδικασίας της εξώθησης και η μηχανική επεξεργασία με τη διαδικασία της αποφλοΐωσης, βοηθά στην αύξηση του βαθμού πεπτικότητας των φυτικών διατροφικών πρωτεϊνών (Venou et al., 2006). Παρόμοιες επεξεργασίες έχουν δοκιμαστεί σε ελαιοκράμβη (Cheng, 2010) για τη διατροφή του γιαπωνέζικου λαβρακιού, σε λούπινο (Burel et al., 1998) για την διατροφή των ιχθυδίων πέστροφας, σε χαρούπι (Nikolopoulou, 2008) για τη διατροφή λαβρακιών βάρους 90 g και σε

φουντούκι (Emre et al., 2008) για τη διατροφή λαβρακιών βάρους 19,16 g. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις πειραμάτων διατροφής ιχθύων η μηχανική και θερμική επεξεργασία έδωσε θετικά αποτελέσματα.

Η επιλογή ενός οσπρίου στη διατροφή των ιχθύων γίνεται βάση κριτηρίων τα οποία αναφέρονται από τον Glencross et al. (2007). Αυτά είναι: η πεπτικότητα του, η γευστικότητα του και η αξιοποίησή του από τον επιθυμητό ιχθύ, η επεξεργασία του στα διάφορα στάδια παρασκευής του σιτηρεσίου και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Βάση αυτών των κριτηρίων έγινε η επιλογή του ρεβιθιού και χαρουπιού.

Οι διάφοροι τύποι επεξεργασίας οσπρίων επηρέασαν το βαθμό αυτοϋδρόλυσης και το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης θετικά χωρίς στατιστικές διαφορές. Το σιτηρέσιο CB το οποίο είχε ιχθυάλευρο ως πηγή διατροφικής πρωτεΐνης έδωσε καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης από την εξωθημένη σόγια χωρίς την ύπαρξη στατιστικών διαφορών (Πίνακας 3.4.). Σε *in vitro* πείραμα η εξωθημένη σόγια έδωσε βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης 24,3 % συγκριτικά με δύο τύπους ιχθυάλευρου, οι οποίοι έδωσαν 25,1 % και 29,8 (Alarcon et al., 2002). Γενικά το σιτηρέσιο CB (Εικόνα 3.2.) με ιχθυάλευρο ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης έδωσε καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης από αυτούς της φυτικής πηγής πρωτεΐνης (ρεβίθι και μπιζέλι).

Στο ίδιο πείραμα άλλου είδους σόγιας ανεπεξέργαστης έδωσε καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης από την εξωθημένη σόγια (Alarcon et al., 2002). Σε πείραμα *in vivo* (Venou et al., 2006) σε άτομα τσιπούρας η διαδικασία της εξώθησης της σόγιας δεν βελτίωσε επαρκώς τους δείκτες της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης αλλά ήταν πλησιέστεροι από τον δείκτη πεπτικότητας του ιχθυαλεύρου. Η τιμή της μεταβλητής παραμέτρου (ΝΤΠ) της εξωθημένης σόγιας υπολογίστηκε με 10,90 και ήταν μεγαλύτερη (Εικόνα 3.2.) από τις τιμές της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ όλων των τύπων επεξεργασίας που έγιναν στο μπιζέλι και στο ρεβίθι. Η διαδικασία εξώθησης μειώνει τους αναστολείς θρυψίνης, οι οποίοι στη σόγια κυμαίνονται 2–6 mg/g (Venou et al., 2006).

Η μείωση των βαθμών της ενζυμικής υδρόλυσης με την εκάστοτε αύξηση του υποστρώματος οφείλεται σε παρεμπόδιση τελικών προϊόντων από αναστολείς κατά κύριο λόγο και την εξάντληση του υποστρώματος (Alarcon et al., 2002).

Η στατιστική επεξεργασία (Πίνακας 3.4.) των πειραματικών αποτελεσμάτων όλων των τύπων επεξεργασίας των οσπρίων δεν διέφερε μεταξύ τους στατιστικώς. Τα σιτηρέσια CA και CB δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά διέφεραν με όλους τους τύπους επεξεργασίας οσπρίων. Το σιτηρέσιο ChPD το οποίο περιέχει αποφλοιωμένο μπιζέλι διέφερε στατιστικώς με όλα τα υπόλοιπα σιτηρέσια.

Από τις τιμές της μεταβλητής παραμέτρου (ΝΤΠ) παρατηρείται πως στο σιτηρέσιο το οποίο περιείχε μπιζέλι (Εικόνα 3.7) η διαδικασία της εξώθησης βελτίωσε τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης (Εικόνα 3.8) χωρίς στατιστικές διαφορές (Πίνακας 3.4.). Σε πείραμα *in vivo* η

διαδικασία εξώθησης του μπιζελιού δεν βελτίωσε με στατιστικές διαφορές τους δείκτες πεπτικότητας σε άτομα τσιπούρας βάρους 200 g (Νικολοπούλου 2008). Στον ατλαντικό σολομό βάρους 0,16 kg, ο οποίος εκτρεφόταν σε θαλασσινό νερό για 12 εβδομάδες, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην πεπτικότητα της πρωτεΐνης του μπιζελιού (35% & 50 %) με αυτή της πρωτεΐνης του ιχθυαλεύρου και της σόγιας (Overland et al., 2009). Στη σύνθεση του μπιζελιού υπάρχουν ορισμένοι αντιδιατροφικοί παράγοντες, οι οποίοι είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι είναι στα υπόλοιπα όσπρια. Το μπιζέλι διαθέτει στη σύνθεσή του μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης και χαμηλότερο ποσοστό υδατανθράκων (Overland et al., 2009).

Η διαδικασία της εξώθησης εκτός από το ότι μειώνει τη δράση των αναστολών πρωτεασών και άλλων αντιδιατροφικών παραγόντων στις πρωτεΐνες (Alarcon et al., 2002), ζελατινοποιεί το άμυλο και υποβιβάζει τη δομική του σύνθεση στους υδατάνθρακες (klameczynska et al., 2001).

Η διαδικασία εξώθησης βελτίωσε λίγο τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης στο ρεβίθι (Εικόνα 3.4.), αλλά σε συνδυασμό με την αποφλοΐωση αυξήθηκαν περισσότερο οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου ΝΤΠ (Εικόνα 3.6.). Παρόλο αυτά η επίδραση της εξώθησης δεν διέφερε στατιστικώς στο ρεβίθι.

Σε πείραμα *in vivo* δεν βελτιώθηκαν στατιστικώς οι δείκτες πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης με τη διαδικασία εξώθησης και εξώθησης και αποφλοΐωσης σε άτομα τσιπούρας βάρους 200 g (Νικολοπούλου, 2008).

Η εξώθηση του ρεβιθιού σε 140°C για 1 έως 24 ώρες απενεργοποιεί τους αναστολείς θρυψίνης (από 6,2 g / kg σε 0,3 g / kg μετά από 24 ώρες) και μειώνει τη διατροφική ποιότητα των πρωτεϊνών και την περιεκτικότητα του ρεβιθιού σε πρωτεΐνες (από 197,1 g / kg σε 15,3 g / kg μετά από 24 ώρες), με αποτέλεσμα μικρότερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης. Αποτελέσματα πειράματος *in vitro* χρησιμοποιώντας την μέθοδο pH-stat (Márquez et al., 1999) με εμπορικά ένζυμα λιπάση. Έτσι δεν συνιστάται η εξώθηση του ρεβιθιού άνω των 4 ωρών. Έχει βρεθεί πως η εξώθηση του ρεβιθιού οδηγεί σε μείωση των διαθέσιμων αμινοξέων λυσίνης κατά 12-15% (Márquez et al., 1999). Η εξώθηση διασπά τις πρωτεΐνες σε μικρές αλυσίδες αμινοξέων με αποτέλεσμα την καλύτερη εκμετάλλευσή τους από των άνθρωπο (Márquez et al., 1999). Η αλλοΐωση της ποιότητας και η μείωση της ποσότητας των πρωτεϊνών του ρεβιθιού και του μπιζελιού είναι μια πιθανή αιτία της μη ύπαρξης στατιστικώς θετικών αποτελεσμάτων από τη διαδικασία εξώθησης στο παρόν το πείραμα.

Σε νεαρά άτομα πέρκας (*Bidyanus bidyanus*) μέσου βάρους 25 g η αποφλοΐωση και η εξώθηση του μπιζελιού βελτίωσε στατιστικώς την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, λόγω της περιεκτικότητας του φλοιού σε αναστολείς θρυψίνης, από 81,85 % σε 90,33 % στην αποφλοΐωση, σε 84,23 % στην εξώθηση και σε 96,36 % στην εξώθηση και αποφλοΐωση (Allan & Booth, 2004). Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα

της χρήσης του συστήματος pH-stat στην παρούσα μελέτη, καθώς η εξώθηση του μπιζελιού δεν απέδωσε στατιστικώς καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης.

Είναι γνωστό πως τα υδροφοβικά αμινοξέα έχουν μικρότερο μοριακό βάρος στο άκρο των δομών τους από ότι στο μέσον (Adler-Nissen J, 1986). Έτσι η υδρόλυση των πρωτεϊνών με λιπάση είναι λιγότερο αποτελεσματική από την υδρόλυση των πρωτεϊνών με πρωτεάσες (Adler-Nissen J, 1986).

Οι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης δεν ξεπερνούν τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης σε όλα τα πειραματικά σιτηρέσια. Αυτό σημαίνει πως δεν υποβιβάζονται από τα προστιθέμενα ένζυμα ολικών αλκαλικών πρωτεασών (Alarcon et al., 2002). Κατά την αυτοϋδρόλυση συμμετέχουν ενδογενή ένζυμα που περιέχονται στα διάφορα σιτηρέσια (Εικόνες 3.1. έως 3.8.).

Όλοι οι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης επηρεάστηκαν από τους διάφορους τύπους επεξεργασίας σε ανάλογη ένταση με αυτή των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης, εκτός από το σιτηρέσιο P το οποίο περιείχε μπιζέλι και είχε μεγαλύτερους βαθμούς αυτοϋδρόλυσης σε σχέση με τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης. Αυτό σημαίνει πως τα προστιθέμενα ένζυμα τσιπούρας υδρόλυσαν αυτό το σιτηρέσιο σε μικρότερο βαθμό με μικρή παρεμπόδιση από τα διάφορα αντιδιατροφικά παράγοντα (Adler-Nissen J, 1986).

Η επίδραση της αποφλοίωσης του ρεβιθιού στο βαθμό αυτοϋδρόλυσης ήταν αρνητική στατιστικώς με τα διάφορα υπόλοιπα σιτηρέσια. Αυτό φαίνεται από την τιμή NTPH του σιτηρεσίου ChPD (Πίνακας 3.5., 3.6.).

Σε πείραμα *in vivo* σε άτομα τσιπούρας βάρους 200 g (Νικολοπούλου 2008) η αποφλοίωση έδωσε στατιστικώς αρνητική επίδραση σε σχέση με το ρεβίθι ChP και το εξωθημένο ρεβίθι ChPx και το εξωθημένο αποφλοιωμένο ρεβίθι ChPDx. Η εξήγηση που δόθηκε για αυτήν την επίδραση ήταν, πως η μείωση της πεπτικότητας των πρωτεϊνών με την αποφλοίωση πιθανόν να οφείλεται στη μείωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου του ρεβιθιού επειδή απομακρύνθηκε και μέρος της εξωτερικής στιβάδας (Νικολοπούλου 2008; klamczynska et al., 2001). Είναι επίσης πιθανόν με την αποφλοίωση να αυξήθηκε το ποσοστό των αναστολέων θρυψίνης που βρίσκονται στις κοτυληδόνες.

Στο πείραμα των Ghavidel & Prakash (2005) η περιεκτικότητα του ρεβιθιού σε πρωτεΐνη αυξήθηκε μετά από την αποφλοίωση από 22,1 % σε 27,1 %, η πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης του ρεβιθιού *in vitro* αυξήθηκε από 64,2 % σε 77,6 % και η περιεκτικότητα του ρεβιθιού σε ταννίνες μειώθηκε από 0,53 σε 0,3%. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης. Τέτοιες διαφορές μπορεί να προκληθούν από τον τύπο του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κατά τον περιορισμό της πεπτικότητας (Adler-Nissen, 1986). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γραμμή βάσης (BL), η αυτοϋδρόλυση η οποία χρησιμοποιείται ως διορθωτική γραμμή χωρίς ένζυμα, για την απάντηση στο ερώτημα εάν αυτές οι διαφορές προκαλούνται από το τύπο του ενζύμου. Η διαδικασία αποφλοίωσης του ρεβιθιού δεν βελτίωσε τους βαθμούς αυτοϋδρόλυσης. Τέτοιες πειραματικές διαφορές

μπορεί να προκαλούνται από τις επιδράσεις των περιβαλλοντολογικών παραγόντων καλλιέργειας και των ποικιλιών του ρεβιθιού και του μπιζελιού (Νικολοπούλου 2008) ή από τη σύνθεση του σιτηρεσίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την υδρόλυση (Alarcon et al., 2002).

Οι βαθμοί αυτοϋδρόλυσης του μπιζελιού είναι καλύτεροι από τους βαθμούς αυτοϋδρόλυσης του ρεβιθιού. Στην ενζυμική υδρόλυση ισχύει το αντίθετο (Εικόνα 3.9., 3.10). Η διαφορετική αυτή δράση εξαρτάται από τη σύνθεση των πρωτεϊνών στη διατροφική ύλη (Adler-Nissen , 1986; Glencross et al., 2007).

ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ:
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΣΙΤΗΡΕΣΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΠΕΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα καταλύοντας τη διάσπαση των διατροφικών πρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο στην αφομοίωση και την εκμετάλλευση τους από τα ψάρια, με συνέπεια να επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη και την αύξηση του βάρους τους. Έτσι η απόδοση των διαφόρων σιτηρεσίων εξαρτάται άμεσα από τη δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων. Μια χαμηλή απόδοση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μη ολοκληρωμένης ανάπτυξης του πεπτικού συστήματος στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ή της μειωμένης ενζυμικής δραστικότητας (Dabrowski, 1984; Lauff & Hofer, 1984). Έχει προταθεί, ότι τόσο τα λεκιθοφόρα ιχθύδια (Jancaric, 1964) όσο και τα ιχθύδια (Dabrowski & Glogowski, 1997) της τσιπούρας αξιοποιούν τα εξωγενή ένζυμα της ζωντανής τροφής (ζωοπλαγκτόν) που προσλαμβάνουν ως ενεργοποιητές των ζυμογόνων στον πεπτικό σωλήνα, προκειμένου να ενισχύσουν την πεπτική διαδικασία. Το γεγονός ότι τέτοια ένζυμα δεν συμπεριλαμβάνονται σε τεχνητά σιτηρέσια, εξηγεί τα καλύτερα συγκριτικά αποτελέσματα της ζωντανής τροφής στα αναπτυσσόμενα ιχθύδια (Zambonino Infante & Cahu, 1994). Κατά συνέπεια, η αύξηση του βάρους, η βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης των θρεπτικών συστατικών των σιτηρεσίων και η μείωση της ρύπανσης είναι σημαντικοί λόγοι που ωθούν στην προσθήκη ενζύμων στα σιτηρέσια. Υπάρχουν τρεις πηγές από τις οποίες οι πρωτεάσες αντλούνται ως ενζυμικά πρόσθετα για τον άνθρωπο και τα διάφορα ζώα συμπεριλαμβανομένων των ιχθύων: ζωικές, φυτικές και μικροβιακοί ή ενδοκυτταρικοί οργανισμοί, ως πηγή εξωγενών ενζύμων (Neeser, 2004).

Στα λαρβικά στάδια, η προσθήκη παγκρεατικού εκχυλίσματος χοίρων είχε σημαντική επίδραση στην αφομοίωση των σιτηρεσίων και την ανάπτυξη των ατελών ιχθυδίων (Kolkovskil et al., 1993). Η πεπτικότητα του σιτηρεσίου προσδιορίστηκε με χρήση ραδιενέργειας και καταδείχθηκε ότι χοιρινό παγκρεατικό εκχύλισμα κατά 5 % του ξηρού βάρους του σιτηρεσίου ενίσχυσε την αφομοίωση του σιτηρεσίου κατά 30 % και την αύξηση του βάρους των ατελών ιχθυδίων κατά 200 %, σε σχέση με ατελή ιχθύδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρας και σιτίστηκαν με σιτηρέσιο χωρίς προσθήκη ενζύμων (Kolkovski, 2001). Στα ιχθύδια (μετά την 55^η ημέρα) το πεπτικό σύστημα έχει διαμορφωθεί (Garcia Hernandez et al., 2001) και υπάρχουν τα πεπτικά ένζυμα, εν τούτοις η προσθήκη πεπτικών ενζύμων στα σιτηρέσια τα οποία βασίζονται σε φυτικές πρωτεΐνες ως πηγή διατροφικής πρωτεΐνης και των πρώτων υλών τους γίνεται για την αύξηση της πεπτικότητας τους και η οποία δεν συνιστάται πολύ (Hardy R. W., 2006^b). Στο σολομό βάρος 276.5 g η

χρήση εμπορικών προτεασών 250 g t⁻¹ αύξησε σημαντικά την πεπτικότητα της πρωτεΐνης, των λιπών και των υδατανθράκων σε σιτηρέσια τα οποία περιείχαν μπιζέλι και (Drew et al., 2004).

Οι ιδιότητες και η δράση των πεπτικών ενζύμων στην τσιπούρα έχουν ήδη μελετηθεί (Alarcon et al., 1998; Psolhiou et al., 2007). Οι πρωτεάσες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν η χυμοθρυψίνη I και II και η θρυψίνη II. Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση της χρήσης ανασυνδυασμένων προτεασών στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης σε σιτηρέσια τσιπούρας. Αναλυτικά, οι ανασυνδυασμένες πρωτεάσες χρησιμοποιήθηκαν:

A) Για τη μελέτη της επίδρασης της προσθήκης του κάθε ανασυνδυασμένου ενζύμου χωριστά στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro* με τη μέθοδο pH-stat, χρησιμοποιώντας την δίαιτα CB, η οποία βασίζεται σε ιχθυάλευρο (Πίνακας 2.1). Η δυνατότητα χρήσης τους θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την ανάγκη χρήσης εκχυλισμάτων πεπτικών ενζύμων ιχθύων για τις *in vitro* μετρήσεις πεπτικότητας, μειώνοντας ταυτόχρονα και τη φυσική διακύμανση της δραστηριότητας που παρατηρείται στα ενζυμικά εκχυλίσματα. Με συνδυασμό της χρήσης μη γραμμικών εξισώσεων για κάθε ανασυνδυασμένο ένζυμο είναι εφικτή η πρόβλεψη του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης υπό την παρουσία καθενός από αυτά.

B) Για τον εμπλουτισμό σιτηρεσίων τσιπούρας και τη μελέτη της επίδρασής τους στην αύξηση του βάρους των ιχθύων. Η δυνατότητα χρήσης τους στα σιτηρέσια θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά την πεπτικότητα σιτηρεσίων τα οποία είναι βασισμένα σε χαμηλές ποιότητας πρωτεΐνη.

Γ) Για τη μελέτη της επίδρασης του εμπλουτισμού σιτηρεσίων τσιπούρας με μείγμα ανασυνδυασμένων ενζύμων στην πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, που περιέχει φυτικές πρώτες ύλες *in vitro* με τη μέθοδο pH-stat.

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. Καταλληλότητα ανασυνδυασμένων προτεασών για *in vitro* μετρήσεις πεπτικότητας (Με χρήση του σιτηρεσίου CB ως υπόστρωμα)

Με τη χρήση του συστήματος pH-stat, όπως αυτό περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 προσδιορίστηκε η δυνατότητα των ανασυνδυασμένων προτεασών να καταλύουν την υδρόλυση διατροφικών πρωτεϊνών. Όπως και στο Κεφάλαιο 2 χρησιμοποιήθηκε το σιτηρέσιο CB, που περιείχε μόνο ιχθυάλευρο ως πηγή διατροφικών πρωτεϊνών. Αντί ενζυμικού εκχυλίσματος πυλωρικών τυφλών, σε κάθε αντίδραση προστέθηκε 1U CHTRI ή CHTRII ή TRPII, σε διαφορετικές αναλογίες ποσότητας σιτηρεσίου ανά U ενζυμικής δραστηριότητας. Η παραγωγή των ενζύμων έγινε στο βακτήριο *E.coli* στέλεχος DE3 coday plus, και στη

συνέχεια απομονώθηκαν με χρωματογραφία. Οι βαθμοί υδρόλυσης που επιτεύχθηκαν με τα ανασυνδυασμένα ένζυμα συγκρίθηκαν με αυτούς των πυλωρικών ενζυμικών εκχυλισμάτων τσιπούρας δραστηριότητας 1U ολικών αλκαλικών πρωτεασών, που είχε σιτιστεί με σιτηρέσιο CB.

Η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την ενζυμική υδρόλυση, μετρήθηκε σύμφωνα με τον (García-Carreño, 1992), με χρήση 1,5 % αζοκαζεΐνης ως υπόστρωμα, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCL, pH=9. Η απορρόφηση του υπερκείμενου καταγραφόταν στα 280nm και η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ως 1 μ g τυροσίνης, το οποίο απελευθεωνόταν κάθε λεπτό, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 1280/M/cm.

4.2.2. Μελέτη εμπλουτισμού σιτηρεσίων με ανασυνδυασμένες πρωτεάσες

4.2.2.1. Παρασκευή σιτηρεσίων

Παρασκευάστηκαν δύο πειραματικά σιτηρέσια: το σιτηρέσιο μάρτυρας (C) και το σιτηρέσιο (E) στο οποίο είχαν ενσωματωθεί επιπλέον οι ανασυνδυασμένα πεπτικές πρωτεάσες (CHTRI, CHTRII, TRPII) που παρήχθησαν σε προηγούμενο στάδιο εργαστηριακά.

Η σύσταση και των δύο σιτηρεσίων ήταν η εξής:

Σόγια (45%), ιχθυάλευρο (29%), σιτάλευρο (12,2%) καθώς και ιχνοστοιχεία με βιταμίνες από το χημικό σκεύασμα (Premix 0,3 % της εταιρίας Biomar Hellenic) το οποίο αναμίχθηκε αρχικά με μικρή ποσότητα ιχθυάλευρου πριν προστεθεί στο μίγμα της τροφής (Alexis et al., 1997). Για την καλύτερη ανάμιξη των συστατικών προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα νερού καθώς και ιχθυελαίου (5,3%). Η ανάδευσή τους έγινε σε αναμείκτη με στρόβιλο (mixer) για 30 λεπτά (Εικόνα 4.3 & 4.4.). Στο πειραματικό σιτηρέσιο (E) βάρους 1 kg προστέθηκαν τα τρία ανασυνδυασμένα ένζυμα σε διαφορετικές ποσότητες: χυμοθρυψίνη I (CHTRI) 10.225 U, χυμοθρυψίνη II (CHTRII) 36.456 U και θρυψίνη II (TRPII) 23.727 U αντίστοιχα, αφού διαλυθήκαν πρώτα σε H₂O. Οι ποσότητες των ενζύμων επιλέχθηκαν στην τύχη αφού δεν υπήρχε σχετική βιβλιογραφία προς καθοδήγηση. Μετά την ομογενοποίηση του μείγματος πραγματοποιήθηκε η σύμπτυξη με τη βοήθεια ενός ειδικού μύλου και η παρασκευή σιτηρεσίου με τη μορφή «μακαρονιού». Τα παραγόμενα σύμπηκτα ξηράνθηκαν σε φούρνο με αέρα σε θερμοκρασία έως και 38 °C για την αποφυγή της καταστροφής θερμοευαίσθητων θρεπτικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, ανασυνδυασμένα ένζυμα, βιταμίνες αλλά και της οξειδωσης λιπαρών οξέων. Τα σύμπηκτα κόπηκαν με το χέρι ύστερα από μερική ψύξη σε πολύ μικρές ποσότητες και διατηρήθηκαν στους -4 °C.

Η περιεκτικότητα των δύο σιτηρεσίων σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldahl (AOAC, 1975). Το σιτηρέσιο με τα ανασυνδυασμένα ένζυμα περιείχε 40,61 % διατροφικής πρωτεΐνης και το σιτηρέσιο χωρίς ένζυμα περιείχε 40,52 % διατροφικής πρωτεΐνης.

4.2.2.2. Πείραμα *in vivo*

Η εκτροφή έγινε στις εγκαταστάσεις του Ε.Λ.ΚΕ.ΘΕ. (Άγιος Κοσμάς, Αθήνα) κατά την περίοδο 20 Νοεμβρίου 2008 έως 10 Ιανουαρίου 2009. Αρχικά, 140 άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*) μέσου βάρους 6,02 g (Εικόνα 4.5.) μοιράστηκαν σε 4 ομάδες των 35 ατόμων. Οι ιχθύες τοποθετήθηκαν σε 4 πολυεστερικές δεξαμενές (Εικόνα 4.2.) οι διαστάσεις των οποίων ήταν: Ύψος = 50 cm (η στάθμη του νερού ήταν στα 40 cm), Πλάτος = 39 cm, Μήκος = 74 cm. Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σε δεξαμενές με ανοιχτό κύκλωμα νερού (Εικόνα 4.1.). Στην Ε9 και στην Ε15 τοποθετήθηκαν οι σιτιζόμενοι με το σιτηρέσιο με ανασυνδυασμένα ένζυμα, στην C10 και στην C16 οι σιτιζόμενοι με το σιτηρέσιο μάρτυρα. Στις 51 ημέρες που διάρκεσε το πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 ζυγίσεις, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής.

Η σίτιση πραγματοποιούνταν σε 3 γεύματα την ημέρα και η ημερήσια χορηγούμενη ποσότητα σιτηρεσίου ήταν 2% του βάρους των ιχθύων. Τα Σαββατοκύριακα μειωνόταν ο αριθμός των γευμάτων σε δύο γεύματα και η ημερήσια χορηγούμενη ποσότητα σιτηρεσίου ήταν ίδια.

Η θερμοκρασία του νερού ήταν $19^{\circ}\text{C} \pm 1,5$, η οποία σταθεροποιήθηκε με τη χρήση θερμαντήρα. Η αλατότητα ήταν σταθερά 38 ‰, το οξυγόνο 15 ppm κατά μέσο όρο και η ανανέωση του νερού γίνονταν με ρυθμό 471,25 ml /20sec ή 1,5l/min. Η ιχθυοπυκνότητα στις δεξαμενές ήταν 1,80 g / L (1 ιχθύς / 3,35L).

Ο συντελεστής αύξησης βάρους (SGR) υπολογίστηκε στα διάφορα διαστήματα της πειραματικής περιόδου ως εξής:

$$\text{SGR} = [(\ln W_f - \ln W_i) / \Delta t] * 100$$

Όπου

$\ln W_f$ = ο φυσικός λογάριθμος του τελικού βάρους

$\ln W_i$ = ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού βάρους

Δt = ημέρες της πειραματικής περιόδου ή ημέρες από την πειραματική περίοδο.

Ο συντελεστής εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου (FCR) υπολογίστηκε στα διάφορα διαστήματα της πειραματικής περιόδου ως εξής:

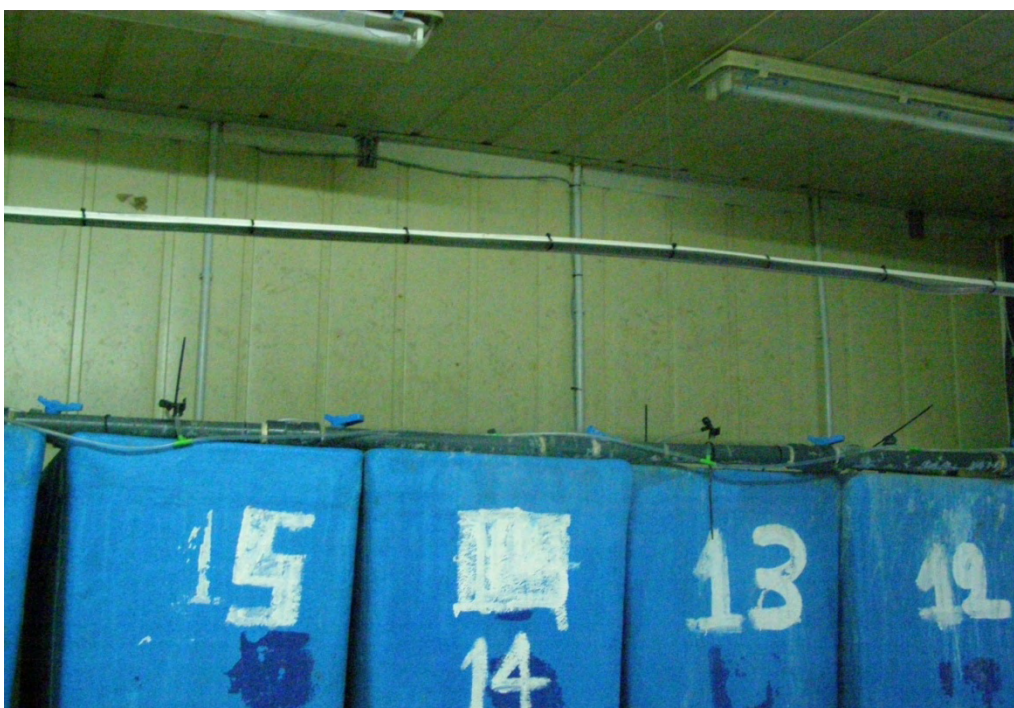
$\text{FCR} = \text{βάρος του χορηγούμενου σιτηρεσίου} / \text{αύξηση του βάρους των ιχθύων (σε συγκεκριμένες ημέρες της πειραματικής περιόδου)}.$

Η σχέση αύξησης βάρους με την καταναλωμένη πρωτεΐνη (PER) υπολογίστηκε ως εξής

$$\text{PER} = (\text{Αύξηση βάρους (g) / ψάρι}) / (\text{Κατανάλωση Πρωτεΐνης / ψάρι})$$



Εικόνα 4.1.: Σύστημα παροχής νερού και οξυγόνου στις πειραματικές δεξαμενές.



Εικόνα 4.2.: Μακρόστενες πειραματικές δεξαμενές μπλέ χρώματος.



Εικόνα 4.3.: Αναμείκτης με στρόβιλο ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή σιτηρεσίου.



Εικόνα 4.4.: Αναμείκτης με στρόβιλο ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή σιτηρεσίου.



Εικόνα 4.5.: Πειραματικά ψάρια τσιπούρας.

4.2.3. *In vitro* μέτρηση του βαθμού υδρόλυσης των σιτηρεσίων C & E και ανάπτυξη της εξίσωσης υδρόλυσης

Με τη χρήση του συστήματος pH-stat, όπως αυτό περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 προσδιορίστηκε ο βαθμός υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων E & C, τα οποία διαφέρουν στην περιεκτικότητά τους σε ανασυνδιασμένα ένζυμα (Ενότητα 4.2.2.). Χρησιμοποιήθηκε το παρασκευασμένο σιτηρέσιο E ως μεταβλητή και το παρασκευασμένο σιτηρέσιο C ως μάρτυρας. Χωρίς την προσθήκη ενζυμικού εκχυλίσματος σε κάθε αντίδραση, με διαφορετικές ποσότητες σιτηρεσίου προσδιορίστηκε ο βαθμός υδρόλυσης. Οι βαθμοί υδρόλυσης που επιτεύχθηκαν με την χρήση των παρασκευασμένων σιτηρεσίων E & C ως υπόστρωμα συγκρίθηκαν μεταξύ τους μη γραμμικώς.

Οι μετρήσεις *in vitro* για αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες: θερμοκρασία 25°C, pH 8, αλατότητα 0 ‰.

4.3. Ανάπτυξη εξίσωσης και στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος *in vivo* (4.2.2.) χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 5 για Windows, εφαρμόζοντας την ανάλυση t-test για την εξέταση των διαφορών μεταξύ των βιολογικών παραμέτρων των ιχθύων, οι οποίοι σιτίστηκαν με σιτηρέσιο με ανασυνδυασμένα ένζυμα διαφόρων αλκαλικών πρωτεασών από βακτήρια και των βιολογικών παραμέτρων των ιχθύων οι οποίοι σιτίστηκαν χωρίς ανασυνδυασμένα ένζυμα.

Για την ανάπτυξη της εξίσωσης του βαθμού υδρόλυσης στα σιτηρέσια C και E (4.2.3) χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρόγραμμα, για την εύρεση και σύγκριση εξισώσεων, την ταξινόμηση των πειραματικών δεδομένων, την εύρεση σταθερών τιμών, τον υπολογισμό του εύρους της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων ενζύμων, τον υπολογισμό της φυσικής κατανομής των πειραματικών δεδομένων, τον υπολογισμό της διαφοράς μεταξύ των προβλεπόμενων βαθμών υδρόλυσης και των πειραματικών δεδομένων (εξέταση επαλήθευσης) και τον υπολογισμό του συντελεστή μη γραμμικών συσχετίσεων ο οποίος υπολογίστηκε σύμφωνα με την αναπτυσσόμενη εξίσωση η οποία επιλέχθηκε από μια σειρά εξισώσεων ως η άριστη εξίσωση η οποία μπορεί να υπολογίσει το συντελεστή συσχέτισης των πειραματικών δεδομένων αυτής με ακρίβεια.

4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.4.1 Καταλληλότητα ανασυνδυασμένων πρωτεασών για *in vitro* μετρήσεις πεπτικότητας

Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση εκθετικής αποσύνθεσης μιας φάσης (One phase exponential decay): $Y = \text{Span} * \exp(-K * X) + \text{Plateau}$

Οι καλύτερες σταθερές τιμές για την τέλεια προσαρμογή της εξίσωσης με τα πειραματικά δεδομένα ήταν:

$$\text{Span} = 82,41$$

$$K = 1,232$$

X = συγκέντρωση σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας

Y = βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών

Σύμφωνα με την εξέταση επαλήθευσης οι εξισώσεις προβλέπουν επιτυχώς τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης (Πίνακας 4.1). Οι τιμές συσχετίσεων είναι μεγαλύτερες του 0,80 σε όλες τις περιπτώσεις με χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεασών κατά την υδρόλυση του σιτηρεσίου CB. Η τιμή της μεταβλητής παραμέτρου της κάθε εξίσωσης αντιπροσωπεύει ένα από τα ανασυνδυασμένα ένζυμα πρωτεασών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν. Η τιμή της μεταβλητής παραμέτρου είναι μεγαλύτερη για εμπλουτισμό με προσθήκη χυμοθρυψίνης II από ότι με εμπλουτισμό άλλων ανασυνδυασμένων ενζύμων, με αποτέλεσμα να έχει η καμπύλη του σιτηρεσίου CB με χρήση χυμοθρυψίνης II καλύτερους προβλεπόμενους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης από ότι με χρήση χυμοθρυψίνης I και την θρυψίνης I.

$$\text{CHTRI} = f(x) = 43,08 * e^{(-0,4851 * X)} + 2,625$$

$$\text{CHTRII} = f(x) = 155,2 * e^{(-1,905 * X)} + 6,224$$

$$\text{TRPII} = f(x) = 93,87 * e^{(-1,656 * X)} + 6,425$$

$$\text{Βαθμοί αυτοϋδρόλύσεων του σιτηρεσίου CB} = f(x) = 64,14 * e^{(-0,5708 * X)} + 7,027$$

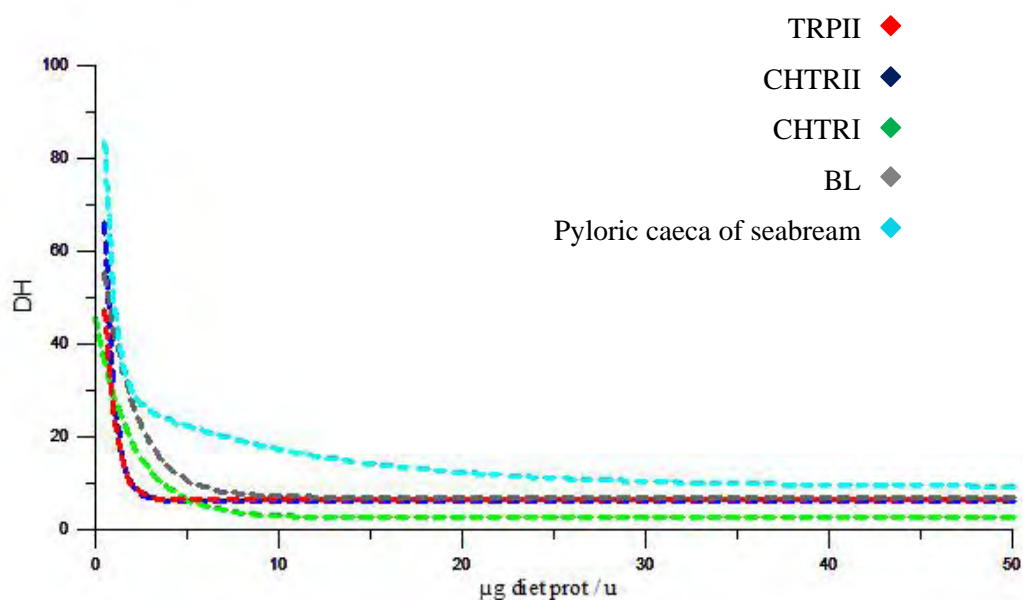
$$\text{Pyloric caeca of seabream} = f(x) = (20,98 * e^{(-0,09637 * X)} + 141,9 * e^{(-1,920 * X)} + 5,428)$$

Κατά τη μεμονωμένη χρήση των μικροβιακών ενζύμων, για την υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου CB (Εικόνα 4.6.) παρατηρούνται τα ακόλουθα:

Η υδρόλυση του σιτηρεσίου CB παρουσία της χυμοθρυψίνης II ήταν υψηλότερη από το βαθμό αυτοϋδρόλυσης (Πίνακας 4.1.). Αντιθέτως μικρές έως μηδενικές μεταβολές παρατηρήθηκαν παρουσία της θρυψίνης II ή της χυμοθρυψίνης I (Εικόνα 4.6.).

Πίνακας 4.1.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης με χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων πρωτεασών. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις

Προστιθέμενο ένζυμο	r^2	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x	Εξέταση επαλήθευσης	Εξέταση D'Agostino-Pearson
CHTRI	0,9067	14	4,68	0,6280*	0,0052
CHTRII	0,9295	19	6,56	0,5692*	0,5911
TRPII	0,8790	19	6,12	0,1922*	0,0087
Αυτοϋδρόλυση	0,6289	387	10,76	0,0823*	$P < 0,0001$
Pyloric caeca of seabream	0,8490	14	6,72	0,2061*	0,0093



Εικόνα 4.6.: Μη γραμμικές συσχετίσεις των εξισώσεων ανασυνδυασμένων ενζύμων των βαθμών ενζυμικών υδρόλυσεων των διατροφικών πρωτεϊνών του σιτηρεσίου CB με τις συγκεντρώσεις του σιτηρεσίου.

Κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων (Πίνακας 4.2.), ταξινομήθηκαν τα πειραματικά δεδομένα σε 5 ομάδες ανάλογα με το χρησιμοποιημένο ένζυμο κατά την υδρόλυση του σιτηρεσίου CB με το σύστημα pH-stat. Το αποτέλεσμα χρήσης του κάθε ενζύμου διέφερε στατιστικώς με το αποτέλεσμα υδρόλυσης των άλλων ενζύμων εκτός από την CHTRI & TRPII .

Πίνακας 4.2.: Συγκρίσεις ζευγών χρησιμοποιώντας το κριτήριο LSD.

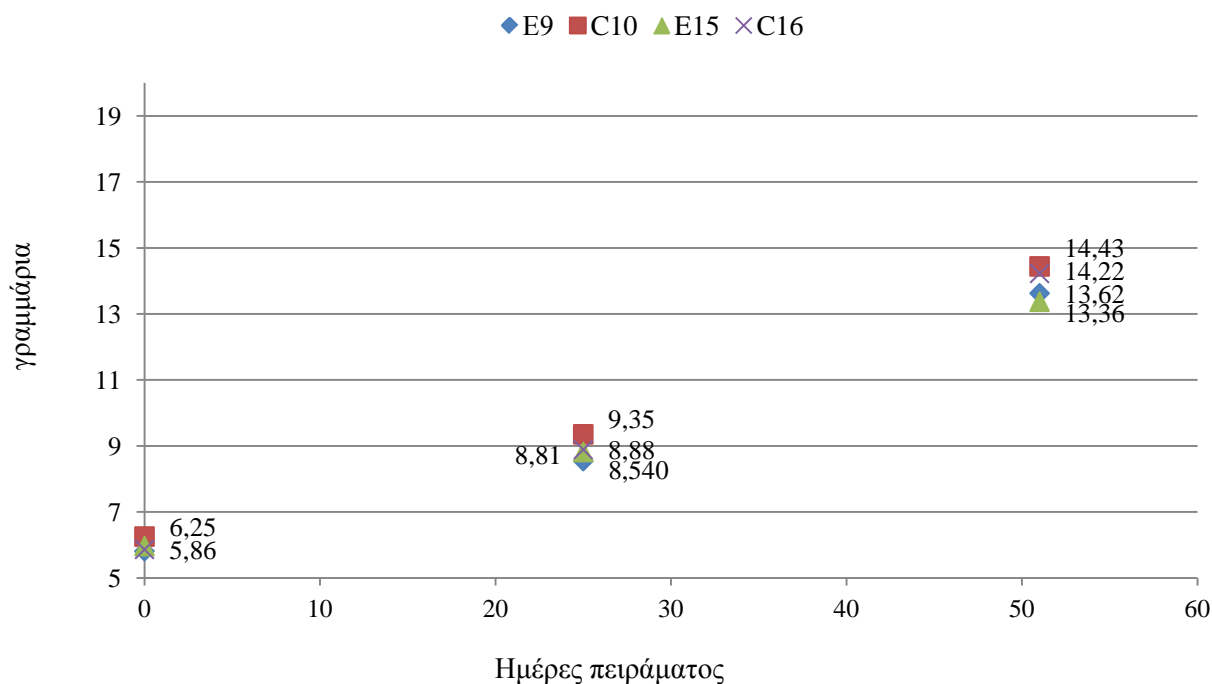
K= Σειρά με την οποία τα ανασυνδυασμένα ένζυμα πρωτεασών έδωσαν καλύτερους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης

Προστιθέμενο ένζυμο	CHTRII	CHTRI	TRPII	Pyloric caeca of seabream	K
CHTRII					2
CHTRI	**				5
TRPII	**	-			4
Pyloric caeca of seabream	*	***	***		1
Αυτοϋδρόλυση	*	*	*	**	3

4.4.2 Υπολογισμός βιολογικών παραμέτρων και στατιστική επεξεργασία του πειράματος εκτροφής

Οι παράμετροι που περιγράφουν την ανάπτυξη των ψαριών, (Πίνακας 4.3.), ήταν λίγο χειρότεροι για την τροφή E, που περιείχε ένζυμα. Εν τούτοις στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρχαν μόνο μεταξύ του τελικού βάρους των δύο ομάδων. Η κατανάλωση τροφής ήταν παρόμοια και για τις δύο ομάδες. Η εκμετάλλευση όμως της τροφής φαινόταν να είναι ελαφρώς χειρότερη για την τροφή με τα ένζυμα, όπως φαίνεται και από τους σχετικούς δείκτες (FCR, FE%) Επίσης η απόθεση βάρους ανά μονάδα πρωτεΐνης (PER) ακολουθούσε την ίδια τάση με την εκμετάλλευση της τροφής. Εν τούτοις και στις δύο περιπτώσεις δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές.

Το βάρος των ιχθύων στην δεξαμενή C10 ήταν μεγαλύτερο από τις υπόλοιπες δεξαμενές (Εικόνα 4.7.) κατά το 2^ο και 3^ο ζύγισμα. Γενικά οι ιχθύες που σιτίστηκαν με το σιτηρέσιο χωρίς ανασυνδιασμένα ένζυμα είχαν μεγαλύτερο μέσο όρο βάρους από τους υπόλοιπους ιχθύς. Οι διαφορές στο βάρος των δύο ομάδων αυξάνονταν σε κάθε ζύγισμα.



Εικόνα 4.7.: Μέσος όρος βάρους των ιχθύων ανά ημέρα ζυγίσματος

Πίνακας 4.3.: Ανάλυση t-test για τις βιολογικές παραμέτρους των ιχθύων κατά την διάρκεια του πειράματος

Βιολογική παράμετρος	Τροφή C	Τροφή E
Αρχικό βάρος (IW)	6,05 ± 0,195	5,88 ± 0,075
Τελικό βάρος (FW)	14,33 ± 0,110 ^a	13,49 ± 0,125 ^b
Αύξηση Β/ψάρι (WINCR)	8,27 ± 0,090	7,61 ± 0,200
Μέση% ημ. κατ. Τροφής (FI)	2,07 ± 0,030	2,08 ± 0,005
FE%	76,87 ± 0,83	73,84 ± 1,96
SGR	1,69 ± 0,050	1,62 ± 0,045
FCR	1,30 ± 0,015	1,35 ± 0,035
% Αύξηση/ψάρι (PCWI)	136,8 ± 5,9	129,3 ± 5,1
PER	1,89 ± 0,02	1,82 ± 0,05
Αριθμός ιχθύων ανά δεξαμενή	35	35
Αριθμός δεξαμενής	2	2
Σύνολο βαρών ανά δεξαμενή γρ.	472,38	501,58
Καταν. Πρωτ/ψάρι	4,37	4,18

4.4.3. Ανάπτυξη εξίσωσης βαθμού υδρόλυσης των C και E σιτηρεσίων

Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση εκθετικής αποσύνθεσης μιας φάσης (One phase exponential decay) η οποία περιγράφεται ως εξής:

$$Y = (\text{Span} * e^{(-K * X)}) + (N \text{ ανασυνδυασμένες πρωτεασών})$$

Οι καλύτερες σταθερές τιμές για την τέλεια προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα ήταν οι εξής:

$$\text{Span} = 57,90$$

$$K = 1,042$$

X = συγκέντρωση σιτηρεσίου / U ενζυμικής δραστηριότητας

Y = βαθμός υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων

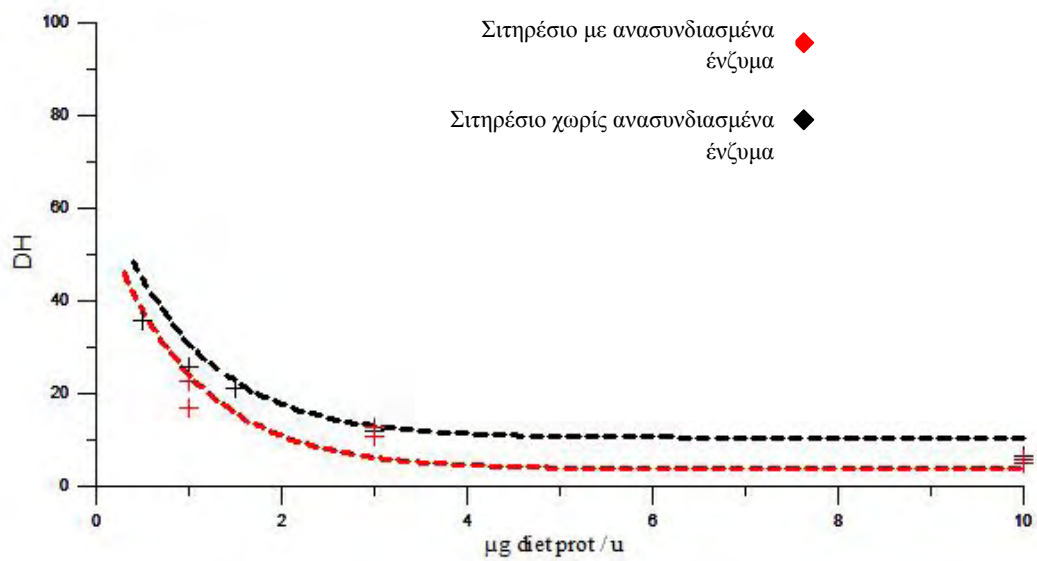
Οπότε η εξίσωση διαμορφώθηκε ως εξής:

$$Y = f(x) + NAI = (57,90 * e^{(-1,042 * X)}) + (N \text{ ανασυνδυασμένων πρωτεασών})$$

Σύμφωνα με την εξέταση επαλήθευσης η αναπτυσσόμενη εξίσωση προβλέπει επιτυχώς τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης και τους βαθμούς αυτουδρόλυσης (Πίνακας 4.4.). Οι τιμές συσχετίσεων είναι μεγαλύτερες του 0,80 και στις δύο περιπτώσεις. Οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων πρωτεασών μεταβάλλονται ανάλογα με την προσθήκη ανασυνδυασμένων πρωτεασών στο σιτηρέσιο. Η τιμή αυτής της παραμέτρου είναι μεγαλύτερη στο σιτηρέσιο μάρτυρα από ότι στο εμπλουτισμένο σιτηρέσιο με αποτέλεσμα η εξίσωση να έχει καλύτερους προβλεπόμενους βαθμούς υδρόλυσης του σιτηρεσίου C από εκείνους του σιτηρεσίου E .

Πίνακας 4.4.: Τα χαρακτηριστικά της εξίσωσης της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων πρωτεασών. Με αστερίσκο σημαίνονται οι επιτυχείς επαληθεύσεις

Είδος σιτηρεσίου	Τιμές (NAI)	r ²	Εξεταζόμενα σημεία	Sy.x	Εξέταση επαλήθευσης	Εύρος τιμών (NAI)
Συνολικά	0	0,8121	24	6,60	0,7574*	0
Μάρτυρας	10,48	0,8573	12	6,09	0,8179*	6,609 - 14,34
Ανασυνδυασμένα ένζυμα	3,676	0,8676	12	4,57	0,2797*	0,7728 - 6,580



Εικόνα 4.8.: Μη γραμμικές συσχετίσεις της εξίσωσης των διαφόρων βαθμών υδρόλυσης των παρασκευασμένων σιτηρεσίων C και E σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του σιτηρεσίου / U πρωτεάσες.

4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.5.1. Καταλληλότητα ανασυνδιασμένων πρωτεασών για *in vitro* υδρόλυση σιτηρεσίων

Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεασών από βακτήρια χρησιμοποιείται σε βιομηχανικό επίπεδο, ως πρόσθετα σε διάφορα προϊόντα, όπως λαχανικά, χυμοί φρούτων, κρέατα, ψάρια, γαλακτοκομικά, αρτοποιία, εύκολα απορροφήσιμες τροφές για αθλητές, βρέφη, ηλικιωμένα άτομα. Ως αρωματικές και γευστικές ύλες (Neeser, 2004). Επίσης έχουν εφαρμογή και στην αύξηση της επίδοσης των οικιακών απορρυπαντικών.

Συνήθως χρησιμοποιείται ένα ένζυμο για την υδρόλυση μιας κατάλληλης πρωτεΐνης στην όποια ειδικεύεται, για την μέτρηση της δραστηριότητας του, το χαρακτηρισμό του και το χαρακτηρισμό του υποστρώματος, όπως συνέβη σε πείραμα το οποίο έγινε για την υδρόλυση β-καζεΐνης ως υπόστρωμα σε θερμοκρασία δωματίου 20 °C, με υδρολύσεις σε ποσοστά 3,2%, 5 %, 5,8 % και 7,4 % από θρυψίνη, όπου σε όλα τα σημεία υπήρχε καλό ποσοστό υδρόλυσης το οποίο σημειώθηκε στο επίπεδο pH 5,2 μεταξύ του διαστήματος pH 1,5 έως pH 11 (Hidalgo et al, 1999).

Η δραστηριότητα της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης μειωνόταν με την αύξηση της αναλογίας θρυψίνης προς χυμοθρυψίνη στο σολομό (Sunde et al., 2004; Rungruangsak-Torrissen et al., 2002). Στο μείγμα ανασυνδιασμένων ενζύμων αυτή η αναλογία θρυψίνης προς χυμοθρυψίνη (T/C ratio) ήταν ικανοποιητική. Αυτή η αναλογία είναι ευαίσθητη σε περιβαλλοντολογικούς (φωτοπερίοδο) και διατροφικούς παράγοντες (ποιότητα πρωτεΐνης) και δρα έντονα στην αύξηση βάρους των ιχθύων (Sunde Jan, 2006).

Σε πείραμα για την επίδραση τριών φαινοτύπων της θρυψίνης (patterns 1, 2 και 2') στο βαθμό πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης *in vitro*, σε συνδυασμό τριών ποιοτικών επιπέδων σιτηρεσίων, υπήρχαν θετικά αποτελέσματα των δεικτών πεπτικότητας τα οποία κατατάχθηκαν με τη σειρά $2 > 1 = 2'$. Με την επανάληψη του ίδιου πειράματος στο σολομό *in vivo* διάρκειας 128 ημερών παρατηρήθηκε μια σημαντική στατιστική διαφορά στο τελικό βάρος των ιχθύων μεταξύ των ομάδων, μετά το πέρας του πειράματος (Bassompierre et al., 1998).

Από την βιβλιογραφία προκύπτει αυξημένη δραστηριότητα της χυμοθρυψίνης σε σχέση με τα άλλα ένζυμα ολικών πρωτεασών. Στα πυλωρικά τυφλά της τσιπούρας ο Deguara βρήκε ότι τη μεγαλύτερη δραστηριότητα χυμοθρυψίνης την ακολούθησε δραστηριότητα θρυψίνης και σε μικρότερες συγκεντρώσεις οι καρβοξυπεπτιδάσες A και B (Deguara et al., 2003).

- Σε σχέση με το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης, χρησιμοποιώντας ένζυμα από εκχυλίσματα ιχθύων τσιπούρας, η επίδραση χρήσης ανασυνδιασμένων μικροβιακών ενζύμων μεμονωμένα στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου CB ήταν μικρότερη σε όλες τις περιπτώσεις, με χρήση χυμοθρυψίνης II, χυμοθρυψίνης I, θρυψίνης II (Εικόνα 4.6.), (Johnston & Coon, 1979).

Η δράση των πρωτεασών εξαρτάται από τη σύνθεση του υποστρώματος (σιτηρεσίου) σε αμινοξέα (Alarcon et al., 2001).

Στο παρόν πείραμα ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης της κάθε εξίσωσης, του κάθε ανασυνδυασμένου ενζύμου χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των δεικτών της πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων.

Γενικά η δράση των έξω πρωτεασών στην υδρόλυση της πρωτεΐνης δηλαδή στον καθορισμού του αριθμού των πεπτιδικών δεσμών σε συγκεκριμένο χρόνο, διαφέρει από αυτή των ένδω πρωτεασών.

- Το ποσοτικό επίπεδο των πεπτιδικών δεσμών των αμινοξέων στο οποίο ειδικεύεται καθένα από τα ανασυνδυασμένα ένζυμα σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσδιορίζει την έκταση της υδρόλυσης (Jackson Scott et al, 1996). Συγχρόνως πρέπει να έχουμε υπόψιν μας ότι όπως έχει προαναφερθεί η ευαισθησία των πεπτιδικών δεσμών σε πρωτεάσες εξαρτάται από την πρόσβαση και την ευελιξία τους (Kato et al., 1985).

Ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης, χρησιμοποιώντας τη χυμοθρυψίνη κατά την υδρόλυση, αντιπροσωπεύει το ποσοστό των πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυλικό άκρο των αρωματικών και άλλων μεγάλων μη πολικών καταλοίπων των αμινοξέων, τα οποία διασπά. Ο βαθμός ενζυμικής υδρόλυσης χρησιμοποιώντας τη θρυψίνη κατά την υδρόλυση αντιπροσωπεύει το ποσοστό των πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυλικό άκρο του αμινοξέος, το οποίο διασπά. Έτσι η κάθε εξίσωση ανασυνδυασμένου ενζύμου που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αναλόγως.

Η θετική επίδραση της χυμοθρυψίνης II (Εικόνα 4.6.), ειδικά στις μικρές ποσότητες σιτηρεσίου να υ ολικών αλκαλικών πρωτεασών την καθιστά κατάλληλη ως πρόσθετη μη διατροφική ύλη στα σιτηρέσια με την ανάλογη δραστηριότητα θρυψίνης.

4.5.2. Επίδραση προσθήκης ενζύμων σε διατροφή τσιπούρας

Στους ιχθύς ο Alarcon πρότεινε τη μελέτη της επίδρασης του κάθε ενζύμου ολικών αλκαλικών πρωτεασών στον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών μιας υδρολυόμενης διατροφικής πρωτεΐνης (Alarcon et al., 2001).

Η προσθήκη ανασυνδυασμένων πρωτεασών, με στόχο τη βελτίωση της πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης στο πείραμα *in vivo*, δεν είχε καμία επίδραση στις βιολογικές παραμέτρους των εκτρεφόμενων ιχθύων όπως η εκμετάλλευση του παρασκευασμένου σιτηρεσίου, ο ρυθμός αύξησης βάρους και η σχέση αύξησης βάρους με την καταναλωμένη πρωτεΐνη (PER). Στο τελικό βάρος των ιχθύων υπήρξαν αρνητικά αποτελέσματα (Πίνακας 4.3.), (Εικόνα 4.7.).

Η χρήση παπαΐνη σε ποσοστά 1%, 2% και 4% του σιτηρεσίου είχε θετικά αποτελέσματα στο συντελεστή αύξησης βάρους, στην αποδοτικότητα της πρωτεΐνης και των υδατανθράκων με

το σιτηρέσιο με 2% να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα ανεξάρτητα από την ποιότητα των υδάτων εκτροφής (Singh et al., 2011).

Σε πείραμα των Kolkovski et al., (1997) για τη μελέτη της επίδραση της προσθήκης πεπτικών ενζύμων (pancreatin) σε σιτηρέσιο ατελών ιχθυδίων λαβρακιού, απεδείχθη ότι δεν υπήρξε καμία επίδραση στην αποδοτικότητα των σιτηρεσίων και στο συντελεστή αύξησης βάρους. Αιτία για αυτό ήταν η μεγάλη συγκέντρωση των παραγόμενων ενζύμων των ιχθύων και ο γρήγορος ρυθμός αύξησης βάρους. Για αυτό συνέστησε την αύξηση των ποσοστών των εξωγενών ενζύμων στο σιτηρέσιο. Όταν συνδυάστηκε η προσθήκη εξωγενών ενζύμων με αρτέμια υπήρξαν θετικά αποτελέσματα.

Η προσθήκη πεπτικών ενζύμων στα σιτηρέσια τσιπούρας σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Kolkovskil et al., 1993; Kolkovski, 2001) δεν εκφράστηκε ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας και αντίστροφα, αλλά ως ποσότητα βάρους σε γραμμάρια με αποτέλεσμα να είναι μη είναι εφικτή η χρησιμοποίηση τους ως δείκτης στα πειράματα *in vivo* και *in vitro* αυτής της μελέτης.

Η τσιπούρα βάρους 50 g παράγει 2000 U ολικών αλκαλικών πρωτεασών μετά από κάθε γεύμα (Alarcon et al., 1998), αριθμός ο οποίος είναι σχετικά μεγάλος σε σύγκριση με την δραστηριότητα η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα *in vitro* και *in vivo* σε αυτήν την μελέτη και η οποία ήταν 1 u.

Ένας γρήγορος ρυθμός αύξησης βάρους σε σχετικά μικρή διάρκεια πειραματικής περιόδου (Dendrinios & Thorpe, 1985), μια αυξημένη συγκέντρωση των ολικών αλκαλικών πρωτεασών των πειραματικών ιχθύων μικρής σχετικά ηλικίας, δικαιολογούν τη μη ευαισθητοποιημένη επίδραση των βιολογικών παραγόντων των σιτηρεσίων σε βασικά βιολογικά κριτήρια των ιχθύων, όπως η περιεκτικότητα τους σε ανασυνδυασμένα ένζυμα πρωτεασών. Επίσης υπάρχει πιθανή υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου E κατά την παρασκευή του σιτηρεσίου, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την χρησιμοποίηση μέρος της για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των ιχθύων.

4.5.3. Αυτοϋδρόλυση πειραματικών σιτηρεσίων (E & C)

Στο πείραμα *in vitro* με τη υδρόλυση του παρασκευασμένου σιτηρεσίου, προέκυψαν οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων πρωτεασών της οποίας η τιμή μειώθηκε στο σιτηρέσιο με τα ανασυνδυασμένα ένζυμα (Πίνακας 4.4.), (Εικόνα 4.8.).

Οι αναπτυγμένες εξισώσεις των πειραματικών δεδομένων από τις οποίες προέκυψαν οι τιμές της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων πρωτεασών έχουν την δυνατότητα πρόβλεψης των βαθμών ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης σε σχέση με τις αναλογίες συγκέντρωσης του σιτηρεσίου ανά μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας των μελετημένων ανασυνδυασμένων πρωτεασών χωρίς στατιστικά σφάλματα.

Προσθέτοντας ο Alarcon αναφέρει ότι μέχρι σήμερα οι περισσότεροι ερευνητές οι οποίοι ασχολούνται με την ανάπτυξη της τεχνικής *in vitro* πεπτικότητας έχουν δυσκολίες συσχέτισμού των αποτελεσμάτων τους με εκείνα τα οποία προέκυψαν από την *in vivo* (Alarcon et al., 2002), (Cone et al., 1993).

Ο Furuya (1991) κατέληξε στο συμπέρασμα συνδυάζοντας τα αποτελέσματά του *in vitro* με άλλα αποτελέσματα πεπτικότητας *in vivo* ότι η προβλεπτικότητα της πεπτικότητας του ειλεού (ileal) σε χοίρους εξαρτάται από το είδος του σιτηρεσίου και το μέγεθος των σύμπηκτων τα οποία έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε σπόρους δημητριακών.

Κατά κανόνα, τα καλύτερα αποτελέσματα πεπτικότητας λαμβάνονται από τις σύνθετες ζωοτροφές, πιθανώς επειδή τα σφάλματα είναι ελάχιστα κατά τον προσδιορισμό των διαφόρων συστατικών (Torrissen & Torrissen, 1984). Στην περίπτωση των ιχθύων οι πρόσθετες δυσκολίες συσχετίζονται με την έλλειψη των στοιχείων, όσον αφορά την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεϊνικής σε ιχθύες εκτός από το σολομό και την τσιπούρα.

Αυτή η μελέτη βοηθάει στην προβλεψιμότητα της πεπτικότητας των διατροφικών πρωτεϊνών των σύνθετων σιτηρεσίων *in vivo* χρησιμοποιώντας το βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης κατά την ανάπτυξη εξισώσεων, περιλαμβάνοντας διάφορους περιβαλλοντολογικούς και βιολογικούς παράγοντες και συσχετίζοντάς τους με τις αντίστοιχες εξισώσεις της γραμμής βάσης των βαθμών αυτουδρόλύσεων, με μορφή διαφορικού λογισμού του εύρους της μεταβλητής παραμέτρου N ανασυνδυασμένων προτεασών.

Έτσι τα αποτελέσματα των βασικών βιολογικών παραμέτρων από το πείραμα *in vivo* και το εύρος των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου από τους βαθμούς ενζυμικής υδρόλυσης *in vitro* μπορεί να ερευνηθούν για την τυχόν συσχέτιση τους.

Τα αποτελέσματα των βιολογικών παραμέτρων του πειράματος *in vivo* όπως μελετήθηκαν και σε άλλα πειράματα (Klaoudatos & Apostolopoulos, 1986; Koven et al., 1992) και τα αποτελέσματα των υδρόλύσεων της πρωτεΐνης του πειράματος *in vitro* των δυο παρασκευασμένων σιτηρεσίων δεν παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικές διαφορές.

Η παρεμπόδιση της υδρόλυσης από αναστολείς είναι απίθανη, καθώς η σύσταση των δύο παρασκευασμένων σιτηρεσίων περιέχει το ίδιο ποσοστό σόγιας (45%), η οποία περιέχει αναστολείς όπως π.χ. στην υδρόλυση του TAME, όπου επιβραδύνθηκε και είχε σχεδόν πλήρως καταργηθεί όταν αυξήθηκε το ποσό του αναστολέα της σόγιας το οποίο επιδρά στη θρυψίνη των ιχθύων στο μείγμα αντίδρασης. Αυτό το ένζυμο το οποίο είναι παρόμοιο και με τη θρυψίνη των θηλαστικών, είναι ευαίσθητο σε αυτόν τον αναστολέα (Rozan et al., 1997 ;Venou et al., 2006; Schmittou, 1993).

Η περιεκτικότητα του παρασκευασμένου σιτηρεσίου με 45 % σόγιας υποδηλώνει την σχετικά υψηλή περιεκτικότητα του σε διατροφικούς αναστολείς, όπως αναστολείς της θρυψίνης (Morris et al., 1995; Adler-Nissen & Olsen, 1979).

Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι βιολογικοί παράγοντες των σιτηρεσίων οι οποίοι επηρεάζουν την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης των σιτηρεσίων όπως η ποσότητα και οι αναλογίες των ανασυνδυασμένων ενζύμων και η σύνθεση του σιτηρεσίου σε διατροφικές ύλες μπορεί να είναι μια αιτία για τη μη ύπαρξη θετικών αποτελεσμάτων του πειράματος *in vivo*, για το συντελεστή αύξησης βάρους SGR, για το συντελεστή εκμετάλλευσης του σιτηρεσίου FCR και για το βάρος των ιχθύων και του πειράματος *in vitro* εφαρμόζοντας την μέθοδο pH-stat στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης των διατροφικών πρωτεϊνών των σιτηρεσίων.

Αυτό ενισχύει το συμπέρασμα ότι η ποσότητα των ανασυνδυασμένων ενζύμων έπαιξαν ρόλο στη μη διαμόρφωση μιας επίδρασης στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης του παρασκευασμένου σιτηρεσίου με ανασυνδυασμένα ένζυμα. Επιπροσθέτως η περιεκτικότητα του παρασκευασμένου σιτηρεσίου ήταν σε ιχθυάλευρο 29 % και σε πρωτεΐνη 40,52 % ενώ το σιτηρέσιο CB περιείχε ιχθυάλευρο 58,4 % και πρωτεΐνη 47,71 %.

Η διαδικασία συσχέτισης γίνεται συνήθως για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των πειραματικών αποτελεσμάτων τόσο στον υπολογισμό του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης *in vitro* (Stern et al., 1997; Michalet-Doreau & Ould-Bah, 1992), χρησιμοποιώντας το σύστημα pH-stat, όσο και των αποτελεσμάτων των πειραμάτων *in vivo*, όπως είχαν γίνει από τους Dimes & Haard (1994) σε σολομό, (Hsu et al., 1977) σε αρουραίους, (Thresher et al., 1989) με ένζυμα χοίρων, για την συσχέτιση της πεπτικότητας *in vitro* και *in vivo*.

Η ενζυμική υδρόλυση η οποία υποστεί το σιτηρέσιο E κατά την παρασκευή του σιτηρεσίου μπορεί να είναι μια αιτία των σχετικών χαμηλών βαθμών υδρολύσεων, αν και ένας υψηλότερος βαθμός υδρόλυσης ενός σιτηρεσίου από άλλο, υποδηλώνει την ύπαρξη καλού συντελεστή πεπτικότητας και αφομοίωσης του, με αποτέλεσμα την καλύτερη εκμετάλλευσή του και έπειτα τη χρήση του στις διάφορες φυσιολογικές εργασίες του ιχθύος, με αποτέλεσμα καλύτερο ρυθμό αύξησης βάρους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αυξημένη ζήτηση των υδατοκαλλιεργητικών προϊόντων είχε ως αποτέλεσμα τη ραγδαία ανάπτυξη την οποία πέτυχε ο τομέας στην περιοχή της Μεσογείου. Οι υδατοκαλλιεργητικές μονάδες αναγκάζονται να παράγουν ζωική πρωτεΐνη υψηλής ποιότητας με όσο το δυνατόν χαμηλές τιμές για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών των ανθρώπων. Σε αυτά τα πλαίσια η επιστημονική κοινότητα πειραματίστηκε για την εύρεση νέων πηγών πρωτεΐνης, όπως οι φυτικές πρωτεΐνες, τη χρήση διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας, τη χρησιμοποίηση μη διατροφικών υλών ως προστιθέμενες ύλες, την επίδραση των περιβαλλοντολογικών και βιολογικών παραγόντων για την αύξηση της αποδοτικότητας των σιτηρεσίων.

Για την εξέταση και αξιολόγηση της καταλληλότητας των σιτηρεσίων στην διατροφή των ιχθύων χρησιμοποιήθηκαν νέες τεχνικές, όπως το σύστημα pH-stat το οποίο μας δίνει πληροφορίες σχετικά με την πεπτικότητα των σιτηρεσίων.

Ο συνδυασμός των πειραματικών δεδομένων πεπτικότητας της διατροφικής πρωτεΐνης από το σύστημα pH-stat με χρήση διαφορικού λογισμού μη γραμμικών συσχετίσεων μεταξύ των αναλογιών της συγκέντρωσης σιτηρεσίων και του βαθμού ενζυμικής υδρόλυσης, έδωσε θετικά αποτελέσματα στη διατύπωση αυτών των δεδομένων, στη μελέτη διαφόρων παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν την πεπτικότητα της διατροφικής πρωτεΐνης, στη συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων *in vitro* με πειραματικά δεδομένα πεπτικότητας *in vivo*.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης για την επίδραση της συγκέντρωσης του σιτηρεσίου στην υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης συνιστούν την ελαχιστοποίηση της ποσότητας του χορηγούμενου σιτηρεσίου και την αύξηση του αριθμού των γευμάτων. Από τη μελέτη της επίδρασης της αλατότητας κατανοούμε ότι η υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου είναι καλύτερη στο 0 ‰. Από τη μελέτη της επίδρασης του διατηρημένου επιπέδου pH κατανοούμε ότι η υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου είναι καλύτερη στο διατηρημένο pH 8. Από τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας κατανοούμε ότι η υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου είναι καλύτερη στους 25 °C. Η προηγούμενη όξινη πέψη αυξάνει την υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης και το διατροφικό ιστορικό επηρεάζει την υδρόλυση της διατροφικής πρωτεΐνης του σιτηρεσίου. Το διατηρημένο επίπεδο pH, η θερμοκρασία, η προηγούμενη όξινη πέψη στο πεπτικό σύστημα των ιχθύων και το διατροφικό ιστορικό είναι παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζονται αποκλειστικά από τις φυσιολογικές εργασίες των ιχθύων και είναι αδύνατη η ανθρώπινη επέμβαση για τη μεταβολή τους.

Με τη χρήση των μεταβλητών παραμέτρων οι οποίες προέκυψαν από την ανάπτυξη της εξίσωσης, έγινε εφικτή η μελέτη της επίδρασης αυτών των παραγόντων στο βαθμό ενζυμικής υδρόλυσης και αυτοϋδρόλυσης και η πρόβλεψη αυτών των βαθμών καθώς και το μέγεθος της επίρειας αυτών των παραγόντων.

Η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης ανασυνδιασμένων ενζύμων για την αύξηση βιολογικών παραμέτρων των ιχθύων συνιστά την περαιτέρω διερεύνηση της ποσότητας των χρησιμοποιημένων ανασυνδιασμένων ενζύμων, των αναλογιών σόγιας στο σιτηρέσιο, την ηλικία των ιχθύων και την διάρκεια της περαματικής περιόδου.

Η εξώθηση και η αποφλοίωση δεν έδωσαν θετικά στατιστικά αποτελέσματα. Η χρήση Του μπιζελίου και το ρεβίθιου *in vitro* δεν έδωσε θετικά στατιστικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης στα σιτηρέσια. Είναι εφικτή η χρήση των τιμών της μεταβλητής παραμέτρου N, τεχνικών επεξεργασίας οσπρίων και πηγής διατροφικής πρωτεΐνης του κάθε σιτηρεσίου, για τη συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων του συστήματος pH-stat με τους δείκτες πεπτικότητας *in vivo* για την ενίσχυση και την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων.

Τέλος το σύστημα pH-stat απεδείχθη ιδιαίτερα εφαρμόσιμο για την αξιολόγηση των σιτηρεσίων και των πρώτων υλών τα οποία προστίθενται στη σύσταση τους και των διάφορων παραγόντων οι οποίοι μπορεί να μεταβάλουν την πεπτικότητα των σιτηρεσίων στους ιχθύες.

- Abaurrea M.A., Nuñez M.I. & Ostos M.V., 1993, Ultrastructural study of the Distal part of the intestine of *Oncorhynchus mykiss*. Absorption of dietary protein, *Micron*, **24**: 445-450.
- Abusdeg Farag, 2004, Η παρούσα κατάσταση των υδρόβιων οργανισμών στην Λιβύη, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Adler-Nissen J., 1986, Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier, New York.
- Adler-Nissen, J. & Olsen, H. S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In: Pour-El, A. (Eds.), *Functionality and protein structure* (pp. 125–146). ACS Symposium Series: Vol. 92. Washington, DC: The Chemical Society.
- Aksnes A. & Opstvedt J., 1998, Content of digestible energy in fish feed ingredients determined by the ingredient-substitution method, *Aquaculture*, **161**: 45-53.
- Alarcón F. J., Díaz M. & Moyano F. J., 2001, Optimization del sistema de pH-stat para la evaluación *in vitro* de la digestibilidad de la proteína en piensos para peces. *Ser Inst Canario Cienc Mar* 43: 346-351.
- Alarcon F.J., Diaz M., Moyano F.J. & Abellan E., 1998, Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*), *Fish Physiology & Biochemistry*, **19**: 257–267.
- Alarcon J. Francisco, Moyano J. Francisco & Díaz Manuel, 2002, Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system, *J. of the Science of Food & Agriculture*, **82**: 697-704.
- Alarcon F.J., Moyano F.J. & Diaz M., 2001, Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. *Aquaculture International*, **9**: 255–267.
- Alarcon F. J., Moyano F. J., Díaz M., Fernández-Díaz C. & Yúfera M., 1999, Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques, *Aquacult Nutr*, **5**: 107-113.
- Alasalvar C., Taylor K. D. A., Zubcov E., Shahidi F. & Alexis M., 2002, Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition, *Food Chemistry*, **79**: 145-150.
- Alexis M.N., Karanikolas K.K., and Richards R.H., 1997, Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* **151**, 209–218.
- Allan L. Geof & Booth A. Mark, 2004, Effects of extrusion processing on digestibility of peas, lupins, canola meal and soybean meal in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) diets, *Aquaculture Research*, **35**: 981-991.
- Alliot E., Febvre A. & Metailler R., 1974, Les protéases digestives chez un téléostéen carnivore, *Dicentrarchus labrax*, *Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys*, **14**: 229–237.
- Alliot E., Pastoureaud A. & Thebault H., 1983, Influence de la temperature et de la salinite sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*, *Aquaculture*, **31**: 181–194.
- Allsopp M., Page R., Johnston P. & Santillo D., 2009, State of the world's oceans, *Environmental Science & Pollution Research*, **16**: 605–606 Springer science.

- Alpers D.H., 1994, *Digestion and absorption of carbohydrates and proteins*. In: Johnson L.R. (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, pp. 1723–1749, 3rd edn. Raven Press, New York.
- Anson M.L., 1938, The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, **22**: 79–89.
- AOAC. 1975. “Official Methods of Analysis.” 12th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Asgeirsson B. & Bjarnason B., 1991, Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin., *Comp. Biochem. Physiol. B*, **99**: 327–335.
- Aufrere J & Michalet-Doreau B, 1988, Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Anim Feed Sci Technol* 20:203-218.
- Axe D., 1995, Factors affecting uniformity of a mix, *Animal Feed Science and Technology*, **53**: 211-220.
- Azevedo P. A., Cho C. Y., Leeson S. & Bureau D. P., 1998, Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Living Resources*, **11**: 227–238.
- Baek H. H. & Cadwallader K. R., 1995, Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products, *J. Food Sci.*, **60**: 929-935.
- Ballestrazzi R., Lanari D. & D'Agaro E., 1998, Performance, nutrient retention efficiency, total ammonia and reactive phosphorus excretion of growing European sea-bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) as affected by diet processing and feeding level, **161**: 55-65.
- Bakke Anne marie, Glover C. & Krogdahl A., 2011, *Feeding, Digestion and Absorption of Nutrients*, In: Groszll Martin, Farrell Anthony P. & Colin J. Brauner (Eds), *The Multifunctional gut of fish*, pp.62, Elsevier, U.S.A..
- Bassompierre M., Ostefeld T.H., McLean E. & Rungruangsak K. Torrisen, 1998, *In vitro* protein digestion, and growth of Atlantic salmon with different trypsin Isozymes, *Aquaculture International*, **6**: 47–56.
- Baumrucker, C. R., Guerino, F., and Huntington, G. B. (1989). In “Absorption and Utilization of Amino Acids” (M. Friedman, ed.), p. 189. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Beamish F.W.H, 1970, Oxygen consumption of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, in relation to swimming speed and temperature, *J. Fish. Res. Board Canada*, **27**: 1209–1214.
- Beccaria C., Diaz J. P., Connesa R. & Chatainb B., 1991, Organogenesis of the exocrine pancreas in the seabass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively, *Aquaculture*, **99**: 339-354.
- Ben-Tuvia A., 1985, Biological basis for the fishery regulation and management of the Bardawil Lagoon, Mediterranean coast of Sinai, Papers presented at the Expert Consultation on the regulation of fishing effort, FAO Fisheries Report 289, Supplement 3. Rome, 214 pp.
- Bernard F., Erlanger B., Kokowsky N. & Cohen, W., 1961, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**: 271-278.
- Beveridge Malcolm C. M., 2004, *Management* Chapter 6, In: *Cage Aquaculture*, Third Edition, pp. 201- 239, by Blackwell Publishing Ltd.

- Boge G., Balocco C., Roche H. & Brichon G., 1993, The influence of calcium and magnesium on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) intestinal brush border membrane purification and activity, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106: 227-232.
- Boggio S. M., Hardy R.W., Babbitt J. K. & Brannon E. L., 1985, The influence of dietary lipid source and alpha-tocopheryl acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), 51: 13-24.
- Booth M., Allan G. & Warner-Smith R., 2000, Effects of grinding, steam conditioning and extrusion of a practical diet on digestibility and weight gain of silver perch, *Bidyanus bidyanus*, *Aquaculture*, **182**: 287-299.
- Bureau D. P., Kaushik S. J. & Cho Y. C., 2002, Bioenergetics, In: Halver J. & Ronald H. (Eds.), *Fish Nutrition, An Elsevier Science Imprint*, pp 16, U.S.A.
- Burel C., Boujard T., Corraze G., Kaushik S. J., Boeuf G., Mol K. A., Van Der Geyten Serge & Kühn E. R., 1998, Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status, *Aquaculture*, 163: 325-345.
- Carneiro D.J., Rantin R.T., Dias T.C.R. & Malheiros E.B., 1994, Interaction between temperature and dietary levels of protein and energy in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). II. Effects on digestibility of protein and transit time through the gastrointestinal tract, *Aquaculture*, **124**: 131.
- Cerda J., Carrillo M., Zanuy S., Ramos J. & Higuera M., 1994, Influence of nutritional composition of diet on sea bass, (*Dicentrarchus labrax*), reproductive performance and egg and larval quality, *Aquaculture*, **128**: 345-361.
- Cheng Z., Ai Q., Mai K., Xu W., Ma H., Li Y. & Zhang J., 2010, Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*, *Aquaculture*, **305**: 102-108.
- Chervinski J., 1975, Sea basses, *Dicentrarchus labrax* (Linne) and *D. punctatus* (Bloch) (Pisces, Serranidae), a control fish in fresh water *Aquaculture* **6**, 249-256.
- Cho C. Y. & Kaushik S. J., 1990, Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *World Review of Nutrition & Dietetics*, **61**: 132-172.
- Cho C.Y. & Slinger S.J., 1979, Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow Trout, Proceedings of the World Symposium on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Vol. II, pp. 239-247, Hamburg, Germany.
- Chong A.S.C., Hashim R. & Ali A.B., 2002, Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods, *Aquaculture Nutrition*, **8**: 229-238.
- Choubert G., Fauconneau B. & Luquet P., 1982, Influence of an elevation of the temperature of water on the digestibility of dry matter, nitrogen and energy of food distributed to the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich), *Reproduction Nutrition Development*, **22**: 941-949.
- Choubert J. M., Bertrand-Harb C. & Nicolas M. G., 1988, Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin, *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 883-892.
- Claireaux G., Lagardere J.P., 1999, Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass, *Journal of Sea Research*, **42**: 157-168.

- Clancy S, Beames R, Higgs D, Dosanjh B, Haard N & Toy B, 1995, Influence of spoilage and processing temperature on the quality of marine fish protein sources for salmonids. *Aquacult Nutr.*, **1**: 169-178.
- Cone J. W. & Van Der Poel A. F. B., 1993, Prediction of apparent ileal protein digestibility in pigs with a two-step *in vitro* method, *J. Sci. Food Agric.*, **62**: 393-400.
- Coves D., Dewavrin G., Breuil G. & Devauchelle N., 1991, *Culture of seabass (Dicentrarchus labrax L.)*, in: McVey J.P. (Eds.), *CRC Handbook of Mariculture*, vol. 11: Finfish Aquaculture, CRC Press, Boca Raton, pp. 3-20, FL, USA.
- Dabrowski K. 1984, The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives, *Reprod. Nutr. Develop.*, **24**: 807-833.
- Dabrowski K., Glogowski J., 1997, Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish, *Hydrobiologia*, **54**: 129-134.
- Deguara S., Jauncey K., Agius C., 2003, Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*, **62**: 1033-1043.
- Dendrinis P. & Thorpe J.P., 1985, Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), *Aquaculture*, **49**: 333-358.
- De Silva S. S. & Perera M. K., 1984, Digestibility in *Sarotherodon Niloticus* fry: Effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility, *Aquaculture*, **38**: 293-306.
- Desrosiers T., Bergeron G. & Savoie L., 1987, Effect of heat treatments on *in vitro* digestibility of delactosed whey proteins as determined by the digestion cell method, *J. Food Sci.*, **52**: 1525-1528.
- Dimes L. E. & Haard N. F., 1994, Estimation of protein digestibility: I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **108A**: 349-362.
- Dimes L. E., Haard N. F., Dong F. M., Rasco B. A., Forster I. P., Fairgrieve W. T., Arndt R., Hardy R. W., Barrows F. T. & Higgs D. A., 1994, Estimation of protein digestibility. II. *In vitro* assay of protein in salmonid feeds. *Comp Biochem Physiol* **108A**: 363-370.
- Diniz Fabio M. & Martin Antonio M., 1996, Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle, *International Journal of Food Science and Technology*, **31**: 419 - 426.
- Diniz Fabio M. & Martin Antonio M., 1997, Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *Int J Food Sci Nutr*, **48**:191.
- Drew M.D, Racz V.J., Gauthier R., Thiessen D.L., 2005, Effect of adding protease to coextruded flax:pea or canola:pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Animal Feed Science and Technology*, **119**: 117-128.
- Dutil, J. D., Lambert Y. & Boucher E., 1997, Does higher growth rate in atlantic cod (*Gadus morhua*) at low salinity result from lower standard metabolic rate or increased protein digestibility?, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **54**: 99-103.
- Eggum B. O., Hansen I. & Larsen T., 1989, Protein quality and digestibility energy of selected food determined in balance trials with rats, *Plants Foods Human Nutr.*, **39**: 13-21.

- Einar Ringø, 1991, Hatchery-reared landlocked Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), from Lake Takvatn reared in fresh and sea water. II. The effect of salinity on the digestibility of protein, lipid and individual fatty acids in a capelin roe diet and commercial feed, *Aquaculture*, **93**: 135-142.
- Emre Y., Sevgili H. & Sanli M., 2008, A preliminary study on the utilization of hazelnut meal as a substitute for fish meal in diets of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), *Aquaculture Research*, **39**: 324-328.
- Eroldogan O.T., Kumlu M., Kir M. & Kiris G., 2005, Enhancement of growth and feed utilization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed supplementary dietary salt in freshwater, *Aquaculture Research*, **36**: 361-369.
- Eroldogan O.T., Kumlu M. & Aktas M., 2004, Optimum feeding rate for European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in seawater and freshwater. *Aquaculture* **231**: 501-515.
- Eshel Ariel, Lindner Pinhas, Smirnoff Patricia, Newton Scott & Harpaz Sheenan, 1993, Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the european sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater, *Comp. Biochem. Physiol.*, **106A**: 621-634.
- Ezquerria J M, 1997, Enzyme technology in aquaculture; *in vitro* evaluation of enzymatic digestibility of dietary proteins by pH-stat for the optimization of diets for cultured *Penaeus vannamei*. *Doctoral Dissertation*, CIBNOR, La Paz, BCS, México.
- F.A.O. Fisheries technical paper, *The production of fish meal and oil* – 142, Food and Agriculture Orgnsnization of the United Nations, 1986.
- F.A.O., 2008 a, The state of world fisheries and aquaculture, pp. 10,17-18, Rome.
- F.A.O., 2008 b, Aquaculture production statistics, fishstat plus version 2.32.
- F.A.O., 2010, Cultured Aquatic Species Information Programme (CASIP).
- Fauconneau, B., Choubert, G., Blanc, D., Breque, J., & Luquet, P., 1983. Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Aquaculture*, **34**: 27–39.
- Fenerci S., Sener E., 2005, *In Vivo* and *in Vitro* Protein Digestibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) Fed Steam Pressured or Extruded Feeds, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **5**: 17-22.
- Fernandez A., Alvarez E. & Basurco B., 2005, *Aquafeed production in the mediteranean region*, In: Montero D., Basurco B. Nengas I, Alexis M., Izquierdo M. (eds.), Mediterranean fish nutrition, pp. 113-119, Cahiers Options Méditerranéennes ; v. 63 Zaragoza : CIHEAM-IAMZ.
- Ferraris R.P., Catacutan M.R., Mabelin R.L. & Jazul A.P., 1986, Digestibility in milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): Effects of protein source, fish size and salinity, *Aquaculture*, **59**: 93-105.
- Fishmeal Market Report - May 2009, <http://www.thefishsite.com>.
- Folk J.E., Piez K.A., Carroll W.R. & Gladner J., 1960, Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme, *J. Biol. Chem.*, **235**: 2272–2277.
- Folk J.E. & Schirmer E.W., 1963, The porcine pancreatic carboxypeptidase A system, *J. Biol. Chem.*, **238**: 3884–3894.

- Furuya S., 1991, Estimation of true ileal digestibility of amino acids with pigs by an *in vitro* method using intestinal fluid, in *In vitro Digestion for Pigs and Poultry*, (Eds) by Fuller M. F., CAB International, Wallingford, pp 117-127.
- Gaertner, H. F., Brachet, P., and Puigserver, A. J., (1989). In “Absorption and Utilization of Amino Acids” (M. Friedman, ed.), Vol. 2, p. 133. CRC Press, Boca Raton.
- Gardner M. L. G., 1984, Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet-a neglected field?, *Biol. Rev.*, **59**: 289-331.
- García-Carreño F.L., 1992, Protease inhibition in theory and practice, *Biotechnol. Educ.*, **3**: 145-150.
- Garcia Hernandez M. P., Lozano M. T., Elbal M. T. & Agulleiro B., 2001, Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Light and electron microscopic studies, *Anatomy and Embryology*, **204**: 39–57.
- Gauthier S. F., Vachon C., Jones J. D. & Savoie L., 1982, Assessment of protein digestibility by *in vitro* enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis, *J. Nutr.*, **112**: 1718-1725.
- Ghavidel Reihaneh Ahmadzadeh & Prakash Jamuna, 2007, The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, *in vitro* iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds, *LWT*, **40**: 1292–1299.
- Giffard-Mena I., Charmantier G., Grousset E., Aujoulat F. & René Castille, 2006, Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in osmoregulation, *Develop. Growth Differ.*, **48**: 139 –151.
- Giffard-Mena Ivone , Lorin-Nebel Catherine , Charmantier Guy , Castille René & Boulo Viviane, 2008, Adaptation of the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) to fresh water: role of aquaporins and Na⁺/K⁺-ATPases, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **150**: 332-338.
- Glencross B.D., Booth M. & Allan G.L., 2007, A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds, *Aquaculture Nutrition*, **13**: 17–34.
- GraphPad Prism 5, 2010.
- Grosell, M., G. De Boeck, O. Johannsson and C.M. Wood. 1999. The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish, *Papophrys vetulus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* C124: 259–270.
- Grosell M. & Jensen F.B., 1999, NO₂–uptake and HCO₃– excretion in the intestine of the European flounder (*Platichthys flesus*), *Journal of Experimental Biology*, **202**: 2103– 2110.
- Grosell M., Laliberte C.N., Wood S., Jensen F.B. & Wood C.M., 2001, Intestinal HCO₃–secretion in marine teleost fish: Evidence for an apical rather than a basolateral Cl–/HCO₃–exchanger, *Fish Physiology and Biochemistry*, **24**: 81–95.
- Grosell M., Wood C.M., Wilson R.W., Bury N.R., Hogstrand C., Rankin J.C. & Jensen F.B., 2005, Active bicarbonate secretion plays a role in chloride and water absorption of the European flounder intestine, *American Journal of Physiology*, **288**: R936–R946.
- Grosell M., 2006, Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation, *J. Exp. Biol.*, **209**: 2813–2827.

- Gudmundsson O. & Petursdottir Th., 1998, Effect of age and water temperature on digestibility and growth in Arctic charr, Seoul National University, *Proceedings Contributed Papers – Vol. I. 8th World Conference on Animal Production (WCAP), June 28–July 4, 1998*, Seoul National University, Seoul, Korea, bls. 280-281.
- Guerreiro P. M., Fuentes J., Flik G., Rotllant J., Power D. M. & Canario A. V. M., 2004, Water calcium concentration modifies whole-body calcium uptake in sea bream larvae during short-term adaptation to altered salinities, *The Journal of Experimental Biology*, **207**: 645-653.
- Hampel H., Cattrijsse A. & Elliott M., 2005, Feeding habits of young predatory fishes in marsh creeks situated along the salinity gradient of the Schelde estuary, Belgium and The Netherlands, *Helgol Mar Res*, **59**: 151–162.
- Hardy R. & Barrows F., 2002, Diet Formulation and Manufacture, In: Halver J. & Ronald H. (Eds.), *Fish Nutrition, An Elsevier Science Imprint*, pp.506-596, U.S.A.
- Hardy R. W., 2006^a, *Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture*. In: E. Suarez et al. (Eds), *Avances en nutrición acuicola VIII*, Aquaculture research institute, pp.410.
- Hardy R. W., 2006^b, New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements. Hagerman Fish Culture Experiment Station, University of Idaho, 3059F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA, pp.216.
- Hidalgo F. & Alliot E., 1988, Influence of water temperature on protein requirement and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, *Aquaculture*, **72**: 115-129.
- Hidalgo F., Alliot E. & Thebault H., 1987, Influence of water temperature on food intake, food efficiency and gross composition of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, *Aquaculture*, **64**:199–207.
- Hidalgo M.C., Urea E. & Sanz A., 1999, Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities, *Aquaculture*, **170**: 267-283.
- Hsu H. W., Vavak D. L., Satterlee L. D. & Miller G. A., 1977, A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*, **42**: 1269-1273.
- Hudon B. and De la Noue J., 1985, Amino acid digestibility in Rainbow trout: Influence of temperature, meal size and type of food, *J. World Maricult. Soc.*, **16**: 101–103.
- Ibeas C., Cejas J., Gomez T., Jerez S., & Lorenzo A., 1996, Influence of dietary n - 3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture*, **142**, 221–235.
- Jackson Scott L., LI M. H. & Robinson E. H., 1996, Use of Microbial Phytase in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Diets to Improve Utilization of Phytate Phosphorus. *Journal of the world aquaculture society*, **27**: 309–313.
- Jancaric, A. 1964. Die Verdauung der Hauptnaehrstoffe beim Karpfen. *Z. Fisch* **12**: 602-684.
- Johnston J. & Coon C. N., 1979, The use of varying levels of pepsin for pepsin digestion studies with animal proteins, *Poultry Sci* **58**: 1271-1273.
- Kakade M. S., 1974, Biochemical basis for the differences in plant protein utilization, *J Agric Food Chem*, **22**: 550-555.

- Kato A., Kamatsu K., Fujimoto K. & Kobayashi K., 1985, Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility, *J Agric Food Chem*, **33**: 931-938.
- Kaushik S.J., 1980, Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 1751-1765.
- Kim J. D., Breque J., Kaushik S. J., 1998, Apparent digestibilities of feed components from fish meal or plantprotein diets in common carp as affected by water temperature, *Aquat. Living Resour.* 11: 269-272.
- Kissil G. Wm., Tandler A., Colorni A. & Elizur A., 2000, *Sea bass culture*, In: Stickney R. R. (Eds), *Encyclopedia of aquaculture*, pp.781, Copyright by John Wiley & Sons, Inc. U.S.A..
- Kissil G.Wm., Tandler A., Elizur A., Colorni A. & Zohar Y., 2000, *Gilthead sea bream culture*, In: Stickney R. R. (Eds), *Encyclopedia of aquaculture*, pp.412, Copyright by John Wiley & Sons, Inc. U.S.A..
- Klamczynska Beata, Zuzanna Czuchajowska, Byung-Kee Baik, 2001, Composition, soaking, cooking properties and thermal characteristics of starch of chickpeas, wrinkled peas and smooth peas, 36: 563–572.
- Klaoudatos S. & Apostolopoulos J., 1986, Food intake, growth, maintenance and food conversion efficiency in the gilthead sea bream (*Sparus auratus*), *Aquaculture*, **51**: 217-224.
- Kolkovski Sagiv, 2001, Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets, *Aquaculture*, **200**: 181–201.
- Kolkovski S., Tandler A. & Izquierdo M. S., 1997, Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, *Aquaculture*, **148**: 313-322.
- Kolkovskil S., Tandler A., Kissil G. Wm. & Gertler A., 1993, The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 203-209.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Sklan, D., 1992, The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* **104**, 91–104.
- Kraljevic M. & Dulcic J., 1997, Age and growth of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in the Mirna Estuary, Northern Adriatic, *Fisheries Research*, **31**: 249-255.
- Krogdahl Ashild, Sundby Anne & Olli Jan J., 2003, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture*, **229**: 335–360.
- Kuzmina V. V. & Gleman A. G., 1997, Membrane-linked digestion in fish, *Reviews in Fisheries Science*, **5**: 99.
- Lauff, M. & Hofer, R. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37: 335-346.

- Lazo J., Romaine R., & Reigh R., 1998, Evaluation of the *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*, *Journal of the World Aquaculture Society*, **29**: 441-450.
- Lemos D. & Nunes A.J.P., 2008, Prediction of culture performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* by *in vitro* (pH-stat) degree of feed protein hydrolysis with species-specific enzymes, *Aquaculture Nutrition*, **14**: 181-191.
- Lovrien Rex E., Conroy Mark J. & Richardson Timothy I., 1994, *Molecular Basis for Protein Separations*, In: Gregory Roger B. (Eds.), Protein-solvent interactions., pp. 521-550, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Löwgren W., Graham H. & Aman P., 1989, An *in vitro* method for studying digestion in the pig. 1. Simulating digestion in the different compartments of the intestine, *Br J Nutr*, **61**: 673-687.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- MacLeod M.G., 1977, Effects of salinity on food intake, absorption and conversion in the rainbow trout *Salmo gairdneri*, *Mar. Biol.*, **43**: 93-102.
- Maier K. J. & Tullis R. E., 1984, The effects of diet and digestive cycle on the gastrointestinal tract pH values in the goldfish, *Carassius auratus* L., Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), *J. Fish Biol.*, **25**: 151-165.
- Marshall W.S. & Grosell M., 2005, *Ion transport, osmoregulation and acid-base balance*. In: *Physiology of Fishes*, D.H. Evans and J.B. Claiborne (eds.). 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 177-230.
- Márquez M. C., Fernández V. & R. Alonso, 1998, Effect of dry heat on the *in vitro* digestibility and trypsin inhibitor activity of chickpea flour, *International Journal of Food Science and Technology*, **33**: 527-532.
- McDonough F. E., Sarwar G., Steinke F. H., Slump P., García S. & Boisen S., 1990, *In vitro* assay for protein digestibility: interlaboratory study, *J Assoc Off Anal Chem*, **73**: 622-625.
- Mehanna S., 2007, A Preliminary Assessment and Management of Gilthead Bream *Sparus aurata* in the Port Said Fishery, the Southeastern Mediterranean, Egypt, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **7**: 123-130.
- Messman M.A. & Weiss W.P., 1994, Use of electrophoresis to quantify ruminal degradability of protein form concentrate feeds. *Animal Feed Science and Technology*, **49**: 25-35.
- Meyers S. P., 1994, Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids, *Pure & Appl. Chem.*, **66**: 1069-1076.
- Michalet-Doreau B. & Ould-Bah M. Y., 1992, *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **40**: 57-86.
- Monsoor M. A. & Yusuf H. K. M., 2002, *In vitro* protein digestibility of lathyrus pea (*Lathyrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*), *International Journal of Food Science and Technology*, **37**: 97-99.

- Moreira I.S., Peres H., Couto A., Enes P. & Oliva-Teles A., 2008, Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles, *Aquaculture*, **274**: 153-160.
- Morris P.C., Davies S.J. & Lowe D.M., 1995, Qualitative requirement for B vitamins in diets for the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Animal Science*, **61**: 419-426.
- Moughan P., Schrama J., Skilton G. & Smith W., 1989, In vitro determination of nitrogen digestibility and lysine availability in meat and bone meals and comparison with in vivo ileal digestibility estimates, *J. Sci. Food Agric.*, **47**: 281-292.
- Moutou Katerina, Panagiotaki Panagiota & Mamuris Zissis, 2004. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: a preliminary study, *Aquaculture Research*, 2004, **35**: 912-914.
- Moyano F. J., Martínez I., Díaz M. & Alarcón F. J., 1999, Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream, (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*), *Comp Biochem Physiol*, **122B**: 327-332.
- Munilla-Mordn R. & Saborido-Rey F., 1996, Digestive Enzymes in Marine Species. I. Proteinase Activities in Gut from Redfish (*Sebastes mentella*), Seabream (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*), *Comp. Biochem. Physiol.*, **113**: 395-402.
- Mutilangi W. A. M., Panyam D. and Kilara A., 1995, Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins, *J Food Sci*, **60**: 1104-1109.
- Mylonas C., Sigelaki I., Divanach P., Mananos E., Carrillo M. and Afonso-Polyviou A., 2003, Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRH α , *Aquaculture*, **221**: 605-620.
- Navarro J.C., Hontoria F., Varo I. & Amat F., 1988, Effect of alternate feeding with a poor long-chain polyunsaturated fatty acid *Artemia* strain and a rich one for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and prawn (*Penaeus kerathurus*) larvae, *Aquaculture*, **74**: 307-317.
- Nchez-Chisng Leticia, Eduardo Cisternas & Oscar Ponce, 1986, Partial purification of pepsins from adult and juvenile salmon fish *Oncorhynchus Keta*. Effect of NaCl on proteolytic activities, *Comp. Biochem. Physiol.*, **87B**: 793-797.
- Neeser Jean-Richard & German J. Bruce, 2004, Bioprocesses and Bio technology for Functional Foods and Nutraceuticals, In: Jun Ogawa & Sakayu Shimizu (Eds.), *Enzymes*, pp.197, Marcel Dekker, U.S.A..
- Nikolopoulou D., 2008, Μελέτη της σύστασης κτηνοτροφικών οσπρίων και φύτρου σπέρματος χαρουπιού και της επίδρασης τους στην φυσιολογία και βιοχημεία της πέψης μεσογειακών ειδών ψαριών, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιοχημεία και Βιοτεχνολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Nikolopoulou D., Moutou K., Fountoulaki E., Venou B., Adamidou S. & Alexis M., 2010, Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology*, Article in Press.
- Nocek J E, 1988, *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *Journal of Dairy Science*, **71**: 2051-2069.

- Nolting M., Ueberschar B. & Rosenthal H., 1999, Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets, *J. Appl. Ichthyol.*, **15**: 027-031.
- Overland M., Sorensen M., Storebakken T., Penn M., Krogdahl A., Skrede A., 2009, Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality, *Aquaculture*, **288**: 305–311.
- Ovissipour Mahmoudreza, Abedian Abdolmohammad, Motamedzadegan Ali, Rasco Barbara, Safari Reza & Shahiri Hoda, 2009, The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera, *Food Chemistry*, **115**: 238-242.
- Pedersen B. & Eggum BO., 1983, Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.*, **49**: 265-277.
- Peres A., Zambonino Infante J.L. & Cahu C., 1998, Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, *Fish Physiology and Biochemistry*, **19**: 145–152.
- Peres Helena & Oliva-Teles Aires, 1999, Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*), *Aquaculture*, **170**: 337–348.
- Peres H. & Oliva-Teles A., 2005, Protein and energy metabolism of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles and estimation of maintenance requirements, *Fish Physiology and Biochemistry*, **31**: 23–31.
- Person-Le Ruyet J., Mahé K., Le Bayon N. & Le Delliou H., 2004, Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Aquaculture*, **237**: 269-280.
- Psochiou E., Mamuris Z., Panagiotaki P., Kouretas D. & Moutou K. A., 2007, The response of digestive proteases to abrupt salinity decrease in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **147**: 156–163.
- Rankin, J.C., Cobb C.S., Franklin S.C. & Brown J.A., 2001, Circulating angiotensins in the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*, acclimated to freshwater and seawater: possible involvement in the regulation of drinking, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **B129**: 311–318.
- Rich N, Satterlee D L & Smith L J, 1980, A comparison of *in vivo* apparent protein digestibility in man and rat to *in vitro* protein digestibility as determined using human and rat pancreatins and commercially available proteases. *Nutrition Reports International*, **21**: 285-300.
- Rodriguez A., Gallardo M.A., Gisbert E., Santilari S., Ibarz A., Sanchez J. & Castello-Orvay F., 2002, Osmoregulation in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**: 345–354.
- Rozan P., Lamghari R., Linder M., Villaume C., Fanni J., Parmentier M. & Méjean L, 1997, *In vivo* and *in vitro* digestibility of soybean, lupin and rapeseed meal proteins after various technological processes. *J Agric Food Sci*, **45**: 1762-1769.
- Rubio V.C., Sánchez-Vázquez F.J. & Madrid J.A., 2005, Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass, *Physiology & Behavior*, **85**: 333-339.

- Rungruangsak-Torrissen K., Rustad A., Sunde J., Eiane SA, Jensen HB, Opstvedt J., Nygard E., Samuelsen TA., Mundheim H., U. Luzzana & G. Venturini, 2002, *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**: 644-654.
- Rust M. B., 2002, *Nutritional Physiology*, In: Halver J. & Ronald H. (Eds.), *Fish Nutrition*, An Elsevier Science Imprint, pp.454-500, U.S.A.
- Santull A., Modica A., Cusenza L., Curatolo A. & D'Amelio V., 1993, Effects of temperature on gastric evacuation rate and absorption and transport of dietary lipids in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **105**: 363-367.
- Satoh K., Hitaka E., Kimoto K., 2000, Effect of water temperature on the protein digestibility of formula feed and mainly-raw-fish diet of young yellowtail, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **66**: 243-348.
- Satterlee L. D., Marshall H. F. & Tennyson J. M., 1979, Measuring protein quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**: 103-109.
- Saunders R. M., Conner M. A., Booth A. N., Bickoff E. M. & Kohler G. O., 1972, Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods, *J. Nutr.*, **103**: 530-535.
- Savoie L., 1994, Digestion and absorption of food: usefulness and limitations of *in vitro* models, *Can J Physiol Pharmacol*, **72**: 407-413.
- Singh Prabjeet, Maqsood Sajid, Samoon Munir Hassan, Phulia Vikas, Danish Mohd, Chahal Ramesh Singh, 2011, Exogenous supplementation of papain as growth promoter in diet of fingerlings of *Cyprinus carpio*, *Int Aquat Res*, **3**: 1-9.
- Shehadeh Z.H. & Gordon M.S., 1969, The role of the intestine in salinity adaptation of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **30**: 397-418.
- Skoch E., Behnke K., Deyoe C. & Binder S., 1981, The effect of steam-conditioning rate on the pelleting process, *Animal Feed Science and Technology*, **6**: 83-90.
- Sleet R.B. & Weber L.J., 1982, The rate and manner of seawater ingestion by a marine teleost and corresponding seawater modification by the gut, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **A72**: 469-475.
- Smith H.W., 1930, The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts, *American Journal of Physiology*, **93**: 480-505.
- Sousa Rita de Cássia S., Coimbra Jane S.R., Garcia Rojas Edwin E., Minim Luis A., Oliveira Fabíola C. & Minim Valéria P.R., 2006, Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk, *Food Science and Technology*, **40**: 1253-1258.
- Spellmana D., McEvoya E., O'Cuinnb G. & FitzGerald R.J., 2003, Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis, *International Dairy Journal*, **13**: 447-453.
- Squires J., Haard N. F. & Feltham L. A. W., 1986, Pepsin isozymes from Greenland cod (*Gadus ogac*). 2. Substrate specificity and kinetic properties, *Can. J. Biochem Cell Biol.*, **65**: 215-222.
- Stern M D, Bach A and Calsamiglia S, 1997, Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J Anim Sci* **75**: 2256-2276.

- Sugiura S. H., 2000, *Digestability*, In: Stickney R. R. (Eds), Encyclopedia of aquaculture, pp.209, Copyright by John Wiley & Sons, Inc. U.S.A..
- Sunde J., Eiane S.A., Rustad A., Jensen H.B., Opstvedt J., Nygard E., Venturini G. & Rungruangsak-Torrissen K., 2004, Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, **10**: 261–277.
- Jan Sunde J., 2006, Digestive protease activities, growth and feed utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Dissertation for the degree doctor scientiarum (Dr. Scient.) at the University of Bergen.
- Swaigood T. D. & Catignami L. G., 1991, Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment, *Adv Food Nutr Res*, **35**: 185-235.
- Tacon A.G.J., 1995, Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming, *Journal of Applied Ichthyology*, **11**: 205–214.
- Tacon A.G.J., 2004, Use of fish meal and fish oil in aquaculture: a global perspective, Aquatic resources, culture and development. 1(1), 3- 14.
- Tandler A., Anav F.A. & Choshniak I., 1995, The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae, *aquaculture*, **135**: 343-353.
- Thresher W. C., Swaisgood H. E. & Catignani G. L., 1989, Digestibilities of the protein in various foods as determined *in vitro* by immobilized digestive enzyme assay (IDEA), *Plants Foods Human Nutr*, **39**: 59-65.
- Tortonese E., 1984, *Moronidae*. In: Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J., & Tortonese E. (Eds.), Fishes of The North- Eastern Atlantic and The Mediterranean, pp. 793–795, Unesco, Paris.
- Torrissen K.R., 1984, Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **77**: 669-674.
- Torrissen K. R. & Torrissen O. J., 1984, Digestive proteases of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) from different river strains: development after hatching, rearing temperature effect and effect of sex and maturation, *Camp. Eiocrhm. Phvsiol.*, **77**: 15-20.
- Tsuzuki Mônica Y., Sugai Juliet K., Maciel Julio Cesar, Francisco Claire J. & Cerqueira Vinícius R., 2007, Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities, *Aquaculture*, **271**: 319–325.
- Usher M.L., Talbot C. & Eddy F.B., 1990, Effects of transfer to seawater on digestion and gut function in Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.), *Aquaculture* 90, 85-96.
- Varsamos S., Wendelaar Bonga S.E., Charmantier G. & Flik G., 2004, Drinking and Na⁺/K⁺ ATPase activity during early development of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* Ontogeny and short-term regulation following acute salinity changes, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **31**: 189 – 200.
- Venou B., Alexis M.N., Fountoulaki E. & Haralabous J., 2006, Effects of extrusion and inclusion level of soybean meal on diet digestibility, performance and nutrient utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **261**: 314-315.

- Watanabe T., Takeushi T., Satoh S. & Kiron V., 1996, Digestible Crude Protein Contents in Various Feedstuffs Determined With Four Freshwater Fish Species, *Fisheries Science*, **62**: 278–282.
- Watanabe W.O., Ernst D.H., Chasar M.P., Wicklund R.I., and Olla B.L., 1993, The effects of temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile, sex-reversed male Florida red tilapia cultured in a recirculating system, *Aquaculture*, **112**: 309-320.
- Wilson, R.W., K. Gilmour, R. Henry and C. Wood. 1996. Intestinal base excretion in the seawater-adapted rainbow trout: A role in acid-base balance? *Journal of Experimental Biology* 199: 2331–2343.
- Wilson R.W., Wilson J.M. & Grosell M., 2002, Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish - why and how?, *Biochimique and Biophysique Acta*, **1566**: 182–193.
- Windell J.T., Foltz J.W. & Sarokon J.A., 1978, Effect of Fish Size, Temperature, and Amount Fed on Nutrient Digestibility of a Pelleted Diet by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri Transactions of the American Fisheries Society*, **107**: 613–616.
- Zambonino Infante J.L. & Cahu C., 1997, Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, *Fish Physiology and Biochemistry*, **12**: 399-408.

F. ABUSDEG, 2012.

Development methodology for measuring *in vitro* digestibility of feeds Mediterranean fish species - Assessment of the nutritional value and growth rate

ABSTRACT

The determination of a diet digestibility in different environmental conditions and under different physiological systems is the first step to evaluate the bioavailability of any living organism.

This study was essential to develop and improve the pH-stat method for determining the digestibility of dietary protein *in vitro* on seabass and study the effects of environmental and biological parameters on the degree of autohydrolysis (BL) and the degree of enzymatic hydrolysis (DH) using statistical and differential calculus form developing equations. Has been study the influence of concentration of the diet, from 9 different concentrations of dietary protein per unit of enzyme activity of total alkaline protease (0.5, 0.75, 1, 1.5, 3, 5, 10, 30, 50 µg / U) on degree of enzymatic hydrolysis and autohydrolysis. The influence of pH degree (pH 8, pH 7 and pH 6) on degree of enzymatic hydrolysis and autohydrolysis using titrisoft program and the influence of temperature (25 ° C, 20 ° C and 15 ° C) using a water bath on degree of enzymatic hydrolysis and autohydrolysis. To study the influence of salinity level of enzymatic hydrolysis and autohydrolysis prepared artificial seawater salinity 35 ‰, which contained the following amounts of salts: 468 mmol NaCl \ L, 10,4 mmol CaSO₄ \ L, 9,97 mmol KHSO₄ \ L, 33,3 mmol MgCl₂ \ L, 7,73 mmol NaSO₄ \ L. The Preparation of artificial brackish water of salinity 15 ‰ was achieved by dilution. To study the effect of acid pre-digestion on degree of enzymatic hydrolysis was at pH 2 and pH 3 and study the effect of the enzyme profile on degree of enzymatic hydrolysis was performed using extracts of seabass pyloric caeca that had fed on locust bean, pea and chickpea.

In total, there were 81 combinations (curves) of different parameters. The results showed that, such decrease in concentration of the substrate influenced positively degree of autohydrolysis and degree of enzymatic hydrolysis statistically, for the reduction of protease inhibitor in the test mixture. The increase of the pH level had a positive degree of autohydrolysis and degree of enzymatic hydrolysis statistically, the number of splitting peptide bonds with negative load during the hydrolysis is higher at level PH 8 than in PH7 than in PH6. The temperature has positively influenced on degree of autohydrolysis and enzymatic hydrolysis statistically that the catalytic property of temperature on the degradation of proteins, then the reduction in salinity affect positively on degree of autohydrolysis and degree of enzymatic hydrolysis statistically as a result of increased electrostatic forces. Thus the various salt ions forming an electric field to bind the charged carboxyl terminus of

peptide chains. The previous acid digestion for one hour at pH 2 and pH 3 did not significantly improve the degree of enzymatic hydrolysis due to the low concentration of substrate per U total acid proteases. The different enzyme profiles of sea bass influences the degree of enzymatic hydrolysis. The locust bean has higher DH than pea and chickpea.

The ninth grade growing equation is as follows :

$$Y = f(x) + f(pH) + f(T^{\circ}C) + f(S\%) + f(TRP) + f(CHTR) + f(CPA) + f(CPB) + f(P) =$$

$$(21,21 * e^{(-0,09631 * X)} + 141,2 * e^{(-1,919 * X)} + 5,428) + (-23,10 + (1,296 + 23,10) / (1 + 10^{(5,955 - pH)})) + (-6,783 + (0,2908 + 6,783) / (1 + 10^{(19,45 - T^{\circ}C)})) + (-12,20 + (0,5186 + 12,20) / (1 + 10^{(S\% - 15,07)})) + (10^{(-1,998 + 1,153 * \log(TRP \text{ U/mg protein}))}) + (-23,84 + 9,082 * \log(CHTR \text{ U/mg protein})) + (10^{(0,3626 + 0,8114 * \log(CPA))}) + (10^{(-1,846 + 6,399 * CPB)}) + (2,424 - 0,4080 * P).$$

Further experiments improved pH-stat method for determining the digestibility of dietary protein experimental diets of different treatment methods pulses (Extrusion and Dehulling) and dietary protein source (plant and animal) in 4 different ratios of concentration of substrate per U enzyme activity of total alkaline proteases seabream (1,2µg, 1,8µg, 1,6µg και 20 µg diet proteins / U) and the correlation values of the variable parameter NTP which resulted from the growth equation, one time used autohydrolysis experiment data and second time used the enzyme hydrolysis experiment data, with results indicators diets with dietary protein digestibility *in vivo* in sea bream, the results were positive correlation indicating the accuracy of pH-stat. The extrusion of chickpea and pea did not statistically different results, the Dehulling of the chickpeas gave statistically negative results due to the reduction of content proteins.

Finally, using the pH-stat method for determining the digestibility of dietary protein feeds prepared one of which contained a recombinant protease enzymes (CHTRI 10,225 U, CHTRII 36,456 U and TRPII 23,727 U) that has produced from the bacteria e coli in different concentration ratios of substrate / U (0.5, 0.75, 1, 1.5, 3, 5, 10, 30, 50 µg / U). The purpose of the enrichment of feeds by recombinant protease enzymes is to increase the rate of digestibility.

Enrichment of diet with recombinant enzymes had a negative effect on degree of hydrolysis of feeds proteins *in vitro*. Also had statistics negative effects on the weight gain of fish, specific growth rate and the Feed conversion ratio. Possible causes of this negative effect is the degradation of endogenous enzymes by the added enzymes, the age of fish, the quantities of the recombinant enzymes, experimental period. the results The correlation coefficient of the range of the variable parameter NAE, which resulted from growth equation with biological parameters (weight of fish, SGR & FCR) of seabream *in vivo* experiment, were

positive. The effect of the addition of each recombinant enzyme separately in degree of enzyme hydrolysis of the feed has been investigated. CHTRII gave better grades enzymatic hydrolysis with statistical differences from other recombinant enzymes but not in relation to pyloric caeca extract from sea bream. The degree of autohydrolysis of CHTRI and TRPII did not differ statistically but the degree of proteins autohydrolysis was higher their stats. In conclusion, the pH-stat method has proved economically and provides results quickly available and easy to perform. The use of non-linear equations is the ideal method of treatment results and correlation with other biological parameters.